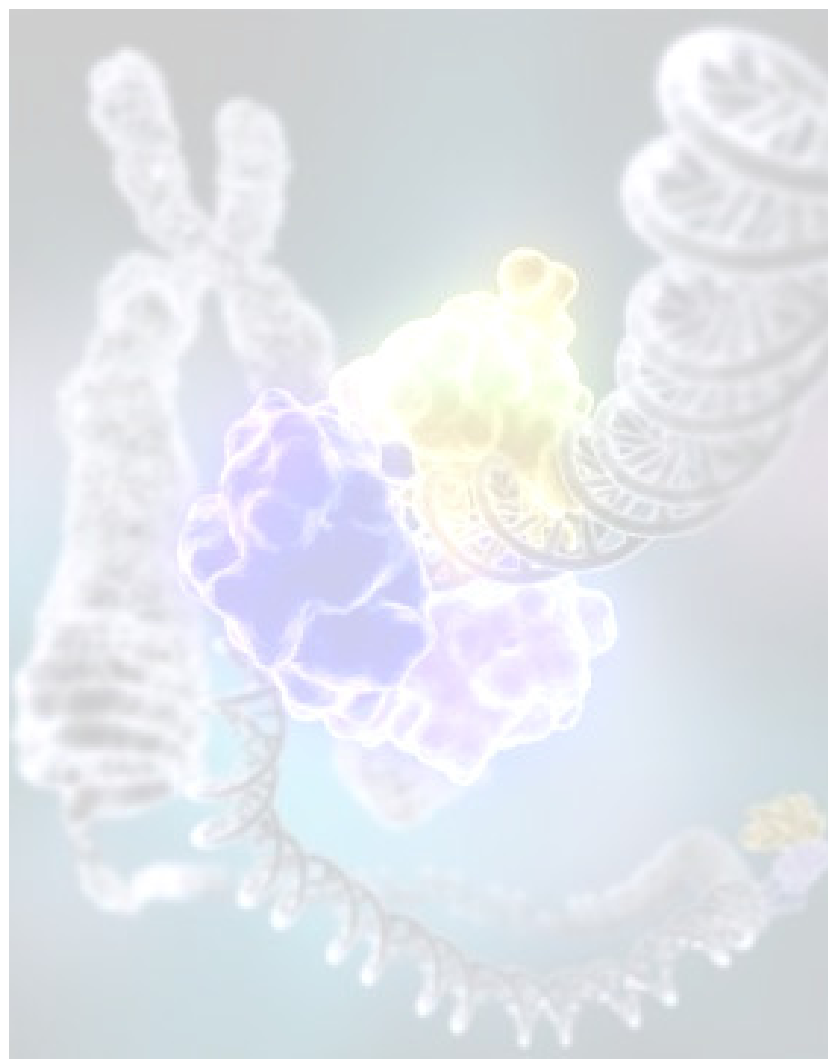


ENFERMEDAD RENAL QUÍSTICA MEDULAR (MCKD): ESTUDIO MOLECULAR Y BÚSQUEDA DE GENES CANDIDATOS.



PATRICIA OUTEDA GARCÍA

Santiago de Compostela





Universidad de Santiago de Compostela

**ENFERMEDAD RENAL QUÍSTICA
MEDULAR (MCKD): ESTUDIO MOLECULAR
Y BÚSQUEDA DE GENES CANDIDATOS**

PATRICIA OUTEDA GARCÍA

Departamento de Medicina.

Facultad de Medicina y Odontología.

Universidad de Santiago de Compostela.



**ENFERMEDAD RENAL QUÍSTICA
MEDULAR (MCKD): ESTUDIO MOLECULAR
Y BÚSQUEDA DE GENES CANDIDATOS**

Memoria que presenta para optar al Grado de Doctor:

Patricia Outeda García

Santiago de Compostela, Julio 2007

El doctor ***D. Xosé Manuel Lens Neo***, licenciado en Medicina por la Universidad de Santiago de Compostela, doctor por la Universidad de Barcelona, Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela:

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral “**ENFERMEDAD RENAL QUÍSTICA MEDULAR (MCKD): ESTUDIO MOLECULAR Y BÚSQUEDA DE GENES CANDIDATOS**” de la Licenciada en Biología Molecular ***D^a. Patricia Outeda García***, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Medicina, Facultad de Medicina y Odontología, considerándola en condiciones para optar al Grado de Doctor y autorizándola para su defensa ante el Tribunal correspondiente.

Y para que conste, se expide el presente certificado en Santiago de Compostela, a 25 de Abril de 2007.

Fdo. Dr. Xosé Manuel Lens Neo

El doctor ***D. Juan Jesús Gómez-Reino Carnota***, Licenciado en Medicina, Profesor titular del Departamento de Medicina y Jefe del Servicio de Reumatología del Hospital Clínico de Santiago,

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral “**ENFERMEDAD RENAL QUÍSTICA MEDULAR (MCKD): ESTUDIO MOLECULAR Y BÚSQUEDA DE GENES CANDIDATOS**” de la Licenciada en Biología Molecular ***D^a. Patricia Outeda García***, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Medicina, Facultad de Medicina y Odontología, considerándola en condiciones para optar al Grado de Doctor y autorizándola para su defensa ante el Tribunal correspondiente.

Y para que conste, se expide el presente certificado en Santiago de Compostela, a 25 de Abril de 2007.

Fdo. Prof. Juan Jesús Gómez-Reino Carnota

**A mis padres, a quienes debo todo lo que soy
A mi hermana Rocío y a mis abuelos
A Chema, por tu paciencia**

A la memoria de mi abuelo

*Vivir no es sólo existir, sino existir y crear,
saber gozar y sufrir y no dormir sin soñar.*

Descansar, es empezar a morir.

Gregorio Marañón, 1887-1960

AGRADECIMIENTOS.

El haber finalizado esta etapa de mi vida me hace sentir además de mayor, feliz principalmente por haber completado mis objetivos a pesar de las inclemencias vividas. Este mundo me ha permitido conocer personas a los que no quiero olvidar nunca más, gracias con todo mi corazón por cada minuto que habéis compartido conmigo, y por ello agradecer en primer lugar al doctor Xosé Manuel Lens, director de este trabajo, la oportunidad de introducirme en este complejo, pero fascinante, mundo de la investigación. Gracias por permitirme formar parte de tu equipo durante todo este tiempo, por los momentos en los que dejaste la bata a un lado para dejar de ser jefe y convertirte en un amigo y consejero, por ser simplemente Lens.

Gracias a ti, Marina, por tu apoyo constante, por estar siempre ahí cuando te necesitaba, por ayudarme a resurgir de la desesperación, por ser en ocasiones más que una amiga, más que una compañera... . Nunca sabré como devolverte tanto cariño.

A mis compañeros de trabajo, tanto a los que ya no están, como a los todavía presentes, gracias por dejar de ser compañeros y brindarme vuestro cariño y vuestra amistad. Adela, a ti gracias por estar siempre aquí, a mi lado, en lo bueno y en lo malo, por permitirme compartir contigo todas tus alegrías y todas tus penas, por tu amistad y gracias por ser alguien tan importante en esta etapa de mi vida. A Julio, por todos los conocimientos que me has dado, que sería de mí sin toda la bioinformática que me has enseñado!, y sobre todo por tu verdadera amistad, puesto que, pese a la distancia, pocas cosas han cambiado.

A mis pequeñas Hens, Carmen y María, que llegasteis revolucionándolo todo, gracias por hacerme sonreír simplemente al pensar que voy a agradecerlos a vosotras, y a Oscar, el *chicken* del corral. Gracias por alegrar esta última etapa de mi tesis y perdón por no haber podido dedicaros más tiempo.

A mi Sonia, por todos esos buenos momentos vividos en la planta 0 y ahora en la -3, gracias por permitirme ser tu amiga.

Quiero agradecer también al Dr. Antonio González su trato hacia mi persona, gracias por invitarme a participar en vuestras reuniones.

Agradecer también a mis compañeros de fatigas con quien he compartido espacio durante todos estos años, a Bruno y Antonio del laboratorio 1, Julio, Rebe, Mariam, Manuel e Isa, del laboratorio 2, Rocío y Ruddy del 4 y Ana y Samu del 5.

Gracias a toda la gente de Anatomía Patológica, principalmente a Elena (que bien me lo pasé de pinchos contigo por la zona vieja...) e Inés del departamento de Inmunología, por vuestra paciencia conmigo y Ángel, Javier, Marta, Luisa y Raquel de Biología, por las risas que nos echamos a cuenta de Sonia, jeje.

Gracias también a la gente de Medicina Legal, por su ayuda, principalmente a Celsa y Susi, mi mentora del Linkage.

A mis compañeros de facultad, con quien he compartido alegrías y lágrimas durante los años de carrera y luego durante la tesis, especialmente a Silvia, perdona por todos los plantones, te prometo recompensa, jeje, Jorge y Peque.

A Raquel, sin duda alguna mi compañera desde la infancia, mi mejor amiga, gracias por los eternos cafés de sábado por la noche, castigándote sin salir por estar demasiado cansada.

A mis compañeras de piso Silvia, Sheila a todas ellas pero en especial a ti Ara, ¡qué voy a hacer yo ahora sin ti!!! Tantos años viviendo contigo (10, ni más ni menos) que ya no sé si sabré vivir con nadie más. Gracias por aguantarme todo, por ayudarme, por ser mi amiga y casi mi hermana, y a ti Patri, ¿cuantos años van?, contigo también he perdido la cuenta, me alegro mucho de haberos conocido.

A mi familia, pero especialmente a mis padres Jose y Mari, sin vosotros nada de esto hubiese sido posible, gracias por vuestra comprensión, cariño, dedicación y por haberme entregado todo lo que hoy soy sin pedirme nunca nada a cambio, pero sobre todo gracias por haber sido mis padres, por ser mi mejor ejemplo, sois mi mayor orgullo.

A mi hermana Rocío, por tu cariño, por intentar comprenderme en mis momentos de desesperación y por ser mi hermana. A Jose, que sepas que no estoy tan loca como crees. A mis abuelines, sobre todo por haber sido mis abuelos, a ti abuela, a ti abuelo, que estarás siempre en mi corazón, os dedico también esta tesis.

Y a ti Chema, gracias por tu comprensión, por tu paciencia, por ser mi vía de escape, mi rincón de tranquilidad, de sosiego, por entender mi trabajo y mis decisiones, por estar siempre conmigo, pero sobre todo, gracias por compartir tu vida conmigo.

INDICE GENERAL

<i>ÍNDICE</i>	<i>i</i>
<i>INDICE DE FIGURAS</i>	<i>v</i>
<i>ÍNDICE DE TABLAS</i>	<i>xi</i>
<i>ABREVIATURAS</i>	<i>xv</i>

INDICE.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. EL COMPLEJO NPH-MCKD	7
1.2. PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD RENAL QUÍSTICA MEDULAR	10
1.3. PATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD RENAL QUÍSTICA MEDULAR	10
1.4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD RENAL QUÍSTICA MEDULAR	11
1.4.1. Principales lesiones renales	11
1.4.2. Principales lesiones extrarrenales	12
1.5. EL COMPLEJO NPH-MCKD/FJHN	13
1.5.1. Biología Molecular del complejo NHP-MCKD	13
1.5.1.1. Biología Molecular de NHP	13
1.5.1.2. Biología Molecular de MCKD	14
1.6. VARIACIÓN GENÉTICA Y METODOLOGÍA PARA SU DETECCIÓN	15
1.6.1. Principales tipos de marcadores de ADN y métodos de detección	16
1.6.1.1. SNP (polimorfismo de base única)	16
1.6.1.2. Minisatélites o VNTR	17
1.6.1.3. Microsatélites o STR	17
1.6.1.4. Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)	18
1.6.1.5. Polimorfismo Amplificado Aleatoriamente (RAPD)	19
1.6.2. Marcadores microsatélites	20
1.6.3. Ligamiento y Recombinación	22
1.6.4. Aplicación del mapeo genético	22

II. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS	27
----------------	----

III. CARACTERIZACION CLÍNICA DE FAMILIAS CON MCKD Y LIGAMIENTO GENÉTICO AL LOCUS 1

3.1. INTRODUCCIÓN	31
3.1.1. Acotamiento del locus 1 (cromosoma 1q21) de MCKD	31
3.1.2. Acotamiento del locus 2 (cromosoma 16p12) de MCKD	32
3.1.2.1. Biología de la uromodulina	33
3.1.2.2. Función de la uromodulina	36
3.1.3. Acotamiento del locus 3 (cromosoma 21q41) de MCKD	37

3.1.3.1. Análisis de ligamiento.	38
3.1.3.2. Análisis mutacional de genes candidatos.	38
3.2. MATERIAL Y MÉTODOS	40
3.2.1. Aspectos clínicos e inclusión de las familias con MCKD.	40
3.2.2. Aspectos clínicos e inclusión de las familias con Nefropatía Intersticial Esporádica	47
3.2.3. Obtención del ADN purificado.	50
3.2.4. Análisis de los marcadores microsatélites	51
3.2.4.1. Marcadores Microsatélite para el locus 1 (Cromosoma 1q21)	52
3.2.4.1.1. Multiplex 1	52
3.2.4.1.2. PCR1	53
3.2.4.1.3. PCR2	53
3.2.4.2. Marcadores Microsatélite para el locus 3 (Cromosoma 1q41)	53
3.2.4.2.1. Duplex A	54
3.2.4.2.2. Duplex B	54
3.2.4.2.3. PCR C	55
3.2.4.2.4. Multiplex D	56
3.2.4.2.5. PCR E	56
3.2.4.3. Desnaturalización.	57
3.2.4.4. Análisis de ligamiento.	57
3.2.4.5. Reacciones de PCR de los genes candidatos.	58
3.2.4.5.1. Gen candidato NCU.	58
3.2.4.5.2. Gen candidato APOA1-BP.	60
3.2.4.5.3. Gen candidato EFNA1.	61
3.2.4.5.4. Gen candidato EFNA3.	63
3.2.4.5.5. Gen candidato ADAM15.	65
3.2.4.5.6. Gen candidato DPM3.	69
3.2.4.5.7. Gen candidato CCT3.	70
3.2.4.5.8. Gen candidato SCAMP3.	71
3.2.4.5.9. Gen candidato AK000210.	72
3.2.4.6. Purificación Enzimática.	73
3.2.4.7.. Reacción de Secuenciación	73
3.2.4.8..Precipitación de las reacciones de secuenciación	73
3.2.4.9. Análisis de Inmunohistoquímica anti-THP, anti-Metargidina	75
3.3. RESULTADOS.	77
3.3.1. Análisis de ligamiento cromosómico de familias MCKD al locus 1q21 y 1q41.	77
3.3.1.1. FAMILIA 3 MCKD	77
3.3.1.2. FAMILIA 6 MCKD	79
3.3.1.3. FAMILIA 7 MCKD	81
3.3.1.4. FAMILIA 11 MCKD	84
3.3.1.5. FAMILIA 13 MCKD	86

3.3.1.6. <i>FAMILIA 15 MCKD</i>	88
3.3.1.7. <i>FAMILIA 20 MCKD</i>	90
3.3.1.8. <i>FAMILIA 29 MCKD</i>	91
3.3.1.9. <i>FAMILIA 33 MCKD</i>	94
3.3.1.10. <i>FAMILIA 34 MCKD</i>	97
3.3.2. <i>Correlación genotipo-fenotipo en familias MCKD</i>	99
3.3.3. <i>Elaboración del mapa físico ligado a la enfermedad en la región 1q21</i>	103
3.3.4. <i>Elaboración del mapa físico ligado a la enfermedad en la región 1q41</i>	106
3.3.5. <i>Búsqueda de mutaciones de los genes candidatos</i>	107
3.3.5.1. <i>Gen candidato NCU</i>	107
3.3.5.2. <i>Gen candidato APOA1-BP</i>	108
3.3.5.3. <i>Gen candidato EFNA1</i>	109
3.3.5.4. <i>Gen candidato EFNA3</i>	111
3.3.5.5. <i>Gen candidato ADAM15</i>	117
3.3.5.6. <i>Gen candidato DPM3</i>	126
3.3.5.7. <i>Gen candidato AK000210</i>	127
3.3.5.8. <i>Gen candidato CCT3</i>	128
3.3.5.9. <i>Gen candidato SCAMP3</i>	128
3.4. <i>DISCUSIÓN.</i>	134

IV. BÚSQUEDA DE OTROS LOCI IMPLICADOS EN MCKD

4.1. <i>INTRODUCCIÓN</i>	147
4.1.1. <i>Búsqueda de otros genes implicados en la enfermedad</i>	147
4.1.1.1. <i>Transporte intracelular de proteínas GPI</i>	149
4.1.1.2. <i>Función de las balsas lipídicas (lipid rafts) y transporte</i>	151
4.1.1.3. <i>Proteínas de la familia MAL</i>	153
4.2. <i>MATERIAL Y MÉTODOS</i>	156
4.2.1. <i>Selección de la cohorte</i>	156
4.2.2. <i>Análisis de Inmunohistoquímica</i>	156
4.2.3. <i>Amplificación de los genes MAL y MAL2</i>	157
4.3. <i>RESULTADOS</i>	162
4.3.1. <i>Distribución de la proteína uromodulina en los grupos UMOD vs. No-UMOD</i>	162
4.3.2. <i>Distribución de las proteínas MAL y MAL2 en el grupo control</i>	164
4.3.3. <i>Distribución de las proteínas MAL y MAL2 en los grupos UMOD vs. No-UMOD</i>	166
4.3.4. <i>Distribución de las proteínas MAL y MAL2 en otras enfermedades</i>	169
4.3.5. <i>Búsqueda de mutaciones en los genes MAL y MAL2</i>	171
4.4. <i>DISCUSIÓN</i>	172

V. CONCLUSIONES

<i>V. CONCLUSIONES.</i>	177
-------------------------	------------

VI. BIBLIOGRAFÍA.

<i>VI. BIBLIOGRAFÍA.</i>	181
--------------------------	------------

VII. ANEXOS

<i>VII. ANEXOS</i>	203
--------------------	------------

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Riñón con múltiples quistes medulares de pequeño tamaño.

Figura 1.2. Representación gráfica de un SNP (Single Nucleotid Polymorphism).

Figura 1.3. Representación de un polimorfismo VNTR.

Figura 1.4. Representación gráfica de un microsatélite con distintos alelos.

Figura 1.5. Representación gráfica de un marcador RFLP y su detección en un gel tras la digestión enzimática.

Figura 1.6. Representación gráfica de un marcador RAPD y su detección en un gel tras su amplificación.

Figura 1.7. Análisis de marcadores microsatélite. Cuatro pacientes distintos con dos marcadores distintos (azul y negro), todos ellos heterocigotos.

Figura 1.8. Ejemplo de pedigrí familiar con haplotipo ligado a la enfermedad. En negro el haplotipo ligado con los alelos 1 3 5 2 8. Los círculos representan el sexo femenino mientras que los cuadrados representan el masculino, las figuras rellenas en negro indican individuos afectados de la familia, mientras que los blancos indican manifestación de la enfermedad desconocida. Los círculos o cuadrados con una N en su interior hacen referencia a individuos sanos.

Figura 3.1. Mapa físico y genético del locus 2. Acotamiento de la región ligada a la enfermedad, genes descritos en la región y secuenciados. El gen UMOD fue inicialmente descartado como responsable de la enfermedad (Pirelli y colaboradores) y confirmado posteriormente por Hart y colaboradores.

Figura 3.2. Distribución de los dominios proteicos en la uromodulina.

Figura 3.3. Diagrama de la biosíntesis y transporte intracelular de la uromodulina. La proteína es transportada del RE hasta el Complejo de Golgi, para la glicosilación. A continuación es transportada por vesículas hasta la membrana apical donde, tras ser cortada con una peptidasa, es liberada al lumen tubular para ser excretada en la orina.

Figura 3.4. Anatomía del riñón. La nefrona es la unidad funcional del riñón, compuesta por un Glomérulo donde se lleva a cabo la filtración, túbulo contorneado proximal, con conexión al distal por medio del asa de Henle. La síntesis de uromodulina está limitada a la rama gruesa ascendente de Henle y comienzo del túbulo contorneado distal (círculo).

Figura 3.5. Distribución geográfica de las familias de MCKD.

Figura 3.6.1. Pedigrí genealógico de la familia 3 con los haplotipos del locus 1.

Figura 3.6.2. Pedigrí genealógico de la familia 3 con los haplotipos del locus 3.

Figura 3.6.3. Pedigrí genealógico de la familia 6 con los haplotipos del locus 1.

Figura 3.6.4. Pedigrí genealógico de la familia 6 con los haplotipos del locus 3. Debido a su pequeño tamaño no se puede concluir si existe ligamiento o no a la enfermedad.

Figura 3.6.5. Pedigrí genealógico de la familia 7 con los haplotipos del locus 1 donde se observa la ausencia de ligamiento.

Figura 3.6.6. Pedigrí genealógico de la familia 7 con los haplotipos del locus 3.

Figura 3.6.7. Pedigrí genealógico de la familia 11 con los haplotipos del locus 1.

Figura 3.6.8. Pedigrí genealógico de la familia 11 con los haplotipos del locus 3.

Figura 3.6.9. Pedigrí genealógico de la familia 13 con los haplotipos del locus 1.

Figura 3.6.10. Pedigrí genealógico de la familia 15 con los haplotipos del locus 1.

Figura 3.6.11. Pedigrí genealógico de la familia 15 con los haplotipos del locus 3.

Figura 3.6.12. Pedigrí genealógico de la familia 20 con los haplotipos del locus 1.

Figura 3.6.13. Pedigrí genealógico de la familia 29 con los alelos de los marcadores microsatélite del locus 1.

Figura 3.6.14. Pedigrí genealógico de la familia 29 con los alelos de los marcadores microsatélite del locus 3.

Figura 3.6.15. Pedigrí genealógico de la familia 33 con los alelos de los marcadores microsatélite del locus 1.

Figura 3.6.16. Pedigrí genealógico de la familia 33 con los alelos de los marcadores microsatélite del locus 3.

Figura 3.6.17. Pedigrí genealógico de la familia 34 con los alelos de los marcadores microsatélite del locus 1.

Figura 3.6.18. Pedigrí genealógico de la familia 34 con los alelos de los marcadores microsatélite del locus 3.

Figura 3.7. Curva de supervivencia entre las familias “locus 1” vs. “otros loci”. La supervivencia observada en otros loci es superior a la estimada para las familias del locus 1.

Figura 3.8. Curva de supervivencia entre las familias “locus 1”, “otros loci” y “locus 2”. Aparentemente la severidad de la enfermedad va en función del locus al que esté asociado, se observa una menor supervivencia entre pacientes afectados por el locus 1, mientras que “otros loci” muestran una forma más leve de la enfermedad.

Figura 3.9. Curvas de supervivencia entre 14 familias descritas en la literatura y nuestras 4 familias con ligamiento al locus 1.

Figura 3.10. Mapa físico y genético del locus 1

Figura 3.11. Mapa físico y genético de la región acotada, marcadores microsatélite utilizados, posición que ocupan en el cromosoma 1 y genes secuenciados. Ninguno de ellos responsable de la enfermedad tipo 3.

Figura 3.12.1. Gen C1orf85 y proteína NCU. Distribución de exones-intrones y regiones UTR. Producto de expresión proteína NCU predominante en riñón y con dos dominios transmembrana descritos.

Figura 3.12.2. Gen APOA1-BP. Distribución de exones-intrones y regiones UTR del gen.

Figura 3.12.3. Gen EFNA1. Distribución de exones-intrones y regiones UTR del gen y de los dos transcritos.

Figura 3.12.4. Gen EFNA3. Distribución de intrones- exones y regiones UTR del gen. Ubicación cromosómica de EFNA1 y EFNA3.

Figura 3.12.5. Conservación proteica evolutiva de la proteína metargidina. En rojo aparecen los aminoácidos en los que se ha detectado un cambio. En gris aparecen las regiones más conservadas de la proteína.

Figura 3.12.6. Representación gráfica de la proteína efrina 3, dominios presentes en su estructura primaria según alineamientos locales obtenidos por el programa predictor de dominios Prosite.

Figura 3.12.7. Dominio Efrina, descrito entre los aminoácidos 27 y 171.

Figura 3.12.8. Delección “in frame” DelTGGGCCCCGGGG. A. Estudio de cosegregación del cambio en la familia con nefropatía intersticial asociada a retraso mental y

hepatomegalia, con padres heterocigotos para la enfermedad y afecta con la delección en homocigosis. **B.** Electroferograma normal donde se aprecian las bases delecionadas. con cambio G>A.

Figura 3.12.9. Cambio V190M (GTG>ATG). **A.** Electroferograma normal, **B.** Electroferograma con cambio G>A. **C.** Cosegregación familiar en la familia MCKD11.

Figura 3.12.10. Gen ADAM15. Distribución de intrones- exones y regiones UTR del gen, y de las distintas variantes de “splicing”.

Figura 3.12.11. Proteína metargidina. Dominios proteicos descritos en la proteína.

Figura 3.12.12. Conservación proteica evolutiva de la proteína metargidina. En rojo aparecen los aminoácidos en los que se ha detectado un cambio. En gris aparecen las regiones más conservadas de la proteína.

Figura 3.12.13. Predicción de dominios estructurales por alineamientos locales en la base de datos Prosite y ubicación en la proteína.

Figura 3.12.14. Cambio W679X. A.. Cosegregación familiar en la familia MCKD15.

Figura 3.12.15. Distribución de la proteína metargidina en colon y riñón. **A.** Expresión positiva células caliciformes y endoteliales. **B.** Distribución lateral y basal de células caliciformes. **C** y **D.** Tejido renal sano con tinción en glomérulos, túbulo contorneado proximal, túbulo contorneado distal y colectores. **E.** Tejido renal de paciente con mutación W679X.

Figura. 3.12.16. Gen DPM3. Distribución de su exón y regiones UTR del gen. Variantes de splicing de Dol-M-Man

Figura. 3.12.17. Gen AK000210. Distribución de su exón y regiones UTR del gen. Variantes de splicing de GON4.

Figura 3.12.18. Gen CCT3. Distribución de su exón y regiones UTR del gen. Variantes de splicing de la chaperona.

Figura 3.12.19. Gen SCAMP3. Distribución de su exón y regiones UTR del gen. Variantes de splicing y transcritos.

Figura 3.12.20. Conservación proteica evolutiva de la proteína propina 1. En rojo aparecen los aminoácidos en los que se ha detectado el cambio.

Figura 3.12.21. Predicción de dominios estructurales por alineamientos locales en la base de datos Prosite y ubicación en la proteína.

Figura 3.12.22. Predicción de dominios estructurales por alineamientos locales en la base de datos Prosite y ubicación en la proteína. Identificación del dominio que caracteriza la familia de proteínas SCAMP.

Figura 3.12.23. Estudio de cosegregación en la familia 47 del cambio D6N. Se excluyó como candidato de la enfermedad por estar presente en el individuo II.2 y ausente en el individuo III.2

Figura 3.12.24. Estudio de cosegregación en la familia 10 del cambio D6N. Se excluyó como candidato de la enfermedad por estar presente en el individuo II.1 y ausente en el individuo III.1

Figura 3.13. Representación gráfica de los dominios funcionales de la proteína y ubicación de los cambios aminoacídicos detectados.

Figura 4.1. Dominios de la proteína uromodulina, y expresión en TAL.

Figura 4.2. Estructura molecular de GPI y lugar de anclaje a proteínas.

Figura 4.3. Organización de la bicapa lipídica. Características de las Balsas lipídicas y principales componentes moleculares.

Figura 4.4. Rutas de transporte apical en células polarizadas. MAL interviene en el transporte directo hacia la membrana apical mientras que MAL2 media la ruta indirecta. A. Estructura de una balsa lipídica. B. Estructura de las proteínas MAL y MAL2 en la balsas lipídicas.

Figura 4.5. Hipótesis del transporte de la uromodulina anclada por su dominio GPI hacia la membrana apical mediada por MAL y MAL2.

Figura 4.6. Distribución de la uromodulina en riñón sano. Reacción positiva en TAL y túbulo colector, glomérulos (flecha) y túbulo contorneado proximal (asterisco) negativos (x4). Se puede apreciar la distribución apical de la proteína formando una estructura en forma de anillo que rodea la luz tubular (x40).

Figura 4.7. Distribución de la uromodulina en los grupos UMOD vs. No-UMOD. B. Distribución de la uromodulina en el grupo No-UMOD, en b1 y b2, procedentes de distintos pacientes se puede comprobar la pérdida de apicalidad de la proteína, con

immunoreactividad de Anti-THP dispersa por todo el citoplasma. C. Distribución de la uromodulina en el grupo UMOD. La alteración de la uromodulina provoca un patrón distinto de distribución en función del tipo de mutación.

Figura 4.8. Distribución de MAL y MAL2 en el riñón. A. Túbulo contorneado distal y colector positivos para la inmunoreacción de MAL en tejido renal sano, glomérulo y túbulo contorneado proximal sin aparente reacción a MAL. a1 y a2. Localización principalmente bajo la membrana apical formando una especie de anillo que rodea la luz del túbulo. B. Túbulo contorneado distal y colector positivos para la inmunoreacción de MAL2 en tejido renal sano, glomérulo y túbulo contorneado proximal sin aparente reacción a MAL2. b1 y b2. Localización principalmente bajo la membrana apical formando una especie de anillo que rodea la luz del túbulo.

Figura 4.9. Distribución de MAL en el riñón. A. Túbulo contorneado distal y colector positivos para la inmunoreacción de MAL en el grupo UMOD, glomérulo y túbulo contorneado proximal sin aparente reacción a MAL. a1. B. Túbulo contorneado distal y colector positivos para la inmunoreacción de MAL en el grupo No-UMOD, glomérulo y túbulo contorneado proximal sin aparente reacción. b1. inmunoreacción citoplasmática en túbulo contorneado distal.

Figura 4.10. Distribución de MAL2 en UMOD vs. No-UMOD. E. Tinción de MAL2 en el grupo UMOD, donde se puede ver un patrón diferente de distribución en el túbulo contorneado distal y colector. F. Elevada reactividad del anticuerpo en el grupo No-UMOD (dilución 1:200), en diversos túbulos se puede apreciar una pseudoestratificación del epitelio con protuberancias apicales hacia la luz del túbulo X40.

Figura 4.11. Distribución de MAL y MAL2 en tejido renal de un paciente con poliquistosis renal autosómica dominante. A y B distribución de MAL y MAL 2 en otras enfermedades renales poliquísticas. C distribución de MAL2 en un quiste.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Complejo MCKD-NPH. Semejanzas y diferencias fenotípicas del complejo MCKD-NPH.

Tabla 3.1. Genes excluidos como candidatos en la región 1q41 (Hodanova et al 2005).

Tabla 3.2. Relación de familias diagnosticadas con MCKD. Descripción familiar, datos clínicos y criterios de inclusión + presencia, - ausencia, ND no existen datos, A: individuos afectados y S: individuos sanos

Tabla 3.3. Datos fenotípicos de los individuos afectados por MCKD. N° Ind: número de individuos en la familia; O: Origen (G:Galicia, M: Madrid, B: Barcelona, USA: Baltimore, C: Canarias); HiperU: hiperuricemia; Cr: creatinina sérica mg/dL *IRCT, insuficiencia renal crónica terminal; E.D.Q: edad de detección de los quistes; IND, no disponible; 2HTA, hipertensión arterial; (-) ausencia. §Ambas concentraciones de creatinina y ácido úrico en el suero fueron determinadas a partir de una misma muestra de sangre.

Tabla 3.4. Individuos con nefropatía intersticial no compatible con nefronoptosis ni MCKD por presentar fenotipo típico de NPH pero con IRCT de MCKD. HiperU: presencia de niveles elevados de ácido úrico en suero (mg/dL), Cr: creatinina sérica (mg/dL), edad de debut, IRCT: Insuficiencia renal crónica terminal. Dentro de las manifestaciones extrarrenales características de la nefronoptosis se han incluido: R.P: Retinosis Pigmentaria; H.B.N: Hipoacusia Neurosensorial Bilateral; H: hepatopatía y R.M: retraso mental.

Tabla 3.5. Relación de los marcadores microsatélite utilizados para el análisis de ligamiento al locus 3. H=Heterocigosidad; T^a A= Temperatura de anillamiento; T.E= Tiempo de Extensión necesario para la amplificación del STR en segundos.

Tabla 3.6. Relación de los marcadores microsatélite utilizados para el análisis de ligamiento al locus 3. H=Heterocigosidad; T^a A= Temperatura de anillamiento; T. Extensión= Tiempo de Extensión necesario para la amplificación del STR.

Tabla 3.7.1. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación del gen NCU, tamaño de las PCR en pares de bases y temperaturas de anillamiento y tiempo en grados centígrados y segundos respectivamente.

Tabla 3.7.2. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación del gen APOA1-BP, tamaño de las PCR en pares de bases y temperaturas de anillamiento y tiempo en grados centígrados y segundos respectivamente.

Tabla 3.7.3. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación del gen EFNA1, tamaño de las PCR en pares de bases y temperaturas de anillamiento y tiempo en grados centígrados y segundos respectivamente.

Tabla 3.7.4. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación del gen EFNA3, tamaño de las PCR en pares de bases y temperaturas de anillamiento y tiempo en grados centígrados y segundos respectivamente.

Tabla 3.7.5. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación del gen ADAM15, tamaño de las PCR en pares de bases y temperaturas de anillamiento y tiempo en grados centígrados y segundos respectivamente.

Tabla 3.7.6. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación del gen DPM3, tamaño de las PCR en pares de bases y temperaturas de anillamiento y tiempo en grados centígrados y segundos respectivamente.

Tabla 3.7.7. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de los exones 12 y 13 del gen CCT3, tamaño de la PCR en pares de bases y temperatura de anillamiento y tiempo en grados centígrados y segundos respectivamente.

Tabla 3.7.8. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación del promotor, región 5'-UTR, exón 1 y exón 2 del gen SCAMP3, tamaño de la PCR en pares de bases y temperatura de anillamiento y tiempo en grados centígrados y segundos respectivamente.

Tabla 3.7.9. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación del exón 9 del gen AK000210, tamaño de la PCR en pares de bases y temperatura de anillamiento y tiempo en grados centígrados y segundos respectivamente.

Tabla 3.8.1. Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 3 para la familia 3.

Tabla 3.8.2. Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 3 para la familia 3.

Tabla 3.8.3. Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 1 para la familia 6.

Tabla 3.8.4. *Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 3 para la familia 6.*

Tabla 3.8.5. *Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 1 para la familia 7.*

Tabla 3.8.6. *Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 3 para la familia 7.*

Tabla 3.8.7. *Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 1 para la familia 11.*

Tabla 3.8.8. *Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 3 para la familia 11.*

Tabla 3.8.9. *Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 1 para la familia 13.*

Tabla 3.8.10. *Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 1 para la familia 15.*

Tabla 3.8.11. *Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 3 para la familia 15.*

Tabla 3.8.12. *Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 1 para la familia 20.*

Tabla 3.8.13. *Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 1 para la familia 29.*

Tabla 3.8.14. *Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 3 para la familia 29.*

Tabla 3.8.15. *Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 1 para la familia 33.*

Tabla 3.8.16. *Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 3 para la familia 33.*

Tabla 3.8.17. *Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 1 para la familia 34.*

Tabla 3.8.18. *Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 3 para la familia 34.*

Tabla 3.9. *Correlación Genotipo-Fenotipo entre familias del locus 1 vs. otros loci. Se analiza la presencia-ausencia de quistes, hiperuricemia, gota e IRCT (Insuficiencia Renal Crónica Terminal). NI. (No Informativo).*

Tabla 3.10. *Comparación de IRCTs. Literatura vs. cohorte estudiada. M: edad media de IRCT en la familia.*

Tabla 3.11.1. *Relación de los cambios detectados en la secuenciación del gen EFNA1. C= cambio conservativo, NC= cambio aminoacídico no conservativo, S= cambio silente.*

Tabla 3.11.2. *Relación de los cambios detectados en la secuenciación del gen EFNA3. C= cambio conservativo, NC= cambio aminoacídico no conservativo, S= cambio silente.*

Tabla 3.11.3. *Relación de los cambios detectados en la secuenciación del gen ADAM15. C= cambio conservativo, NC= cambio aminoacídico no conservativo, S= cambio silente.*

Tabla 3.14. *Cambios nucleotídicos en los genes AK000210, CCT3 y SCAMP3 descritos en la literatura contrastados con los resultados del laboratorio.*

Tabla 4.1. *Parejas de cebadores usados para la amplificación de los genes MAL y MAL2. T: Tamaño de las PCRs, temperatura de hibridación.*

Tabla 4.2. *Comparación de la distribución de uromodulina descrita en la literatura frente a la observada en el presente estudio.*

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADAM15	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
APOA1-BP	Apolipoproteína a1 Binding Protein (Apolipoproteína A1 de unión a proteínas)
ARN	ácido ribonucleico
cM	centimorgan
cm	centímetro
dL	decilitro
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Dideoxinucleótido
EDTA	Ethylene Diamino TetraAcético
EGF	Epidermal Growth Factor (Factor de crecimiento Epidermal)
ESRD	End Stage Renal Disease
EXO1	Exonucleasa I
FJHN	Familial Juvenile Hyperuricemic Nephropathy (Nefropatía Hiperuricémica Familiar Juvenil)
GPI	Glucosilfosfatidilinositol
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidad
HTA	Hipertensión Arterial
IRCT	Insuficiencia Renal crónica terminal
Kb	kilobase
kD	kilodalton
MCKD	Medullary Cystic Kidney Disease
mg	miligramo
min.	minuto
mL	mililitro
mM	milimol
mm	milímetro
ng	nanogramo
NPH	Normal-pressure Hydrocephalus (nefronoptosis o hidrocefalia normotensa)
°C	grado Centígrado
pb	pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PKC	Protein Kinasa C
pmol	picomoles
QTL	Quantitative Trait Locus
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA (Amplificación al azar de fragmentos polimórficos del ADN)
rcf	Relative Centrifugal Force (Fuerza de centrifugación relativa)

RE	Retículo Endoplásmico
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismos de longitud de Fragmentos de restricción)
rpm	Revolutions per minute (revoluciones por minuto)
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase (Fosfatasa Alcalina de camarón)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de un solo nucleótido)
STR	Short Tandem Repeat (Repeticiones breves en tandem)
TAL	Thick Ascending Limb
Taq polimerasa	Thermus acuaticus ADN polimerasa
TCD	Túbulo Contorneado Distal
TCP	Túbulo Contorneado Proximal
THP	Tamm-Horsfall protein
U	Unidad
UTR	Untranslated region (Región no traducida)
VNTR	Variable Nucleotide Tandem Repeat (Número variable de repeticiones en tandem)
ZP	Dominio Zona Pellucida
μL	microlitro
μM	micromolar

I. INTRODUCCIÓN

Abstract.

Medullary cystic kidney disease (MCKD) and nephronophthisis (NPH) are included in a group of inherited tubulo-interstitial nephritis, which has been referred to as NPH-MCKD complex. Although MCKD and NPH share morphological features, they differ in several aspects. The most common variant is recessive juvenile NPH, with onset in childhood and leading to end-stage renal disease (ESRD) within the 2nd decade of life. MCKD is a dominant condition recognized in later life and leading to ESRD at the age of 50 years. Hyperuricemia, hypertension and gout can be associated features as extrarenal manifestations.

Originally, NPH and MCKD were considered separate entities. Subsequently, it has been suggested that the two diseases were a single disorder due to the clinical-pathological identity. This unifying conception was later refuted due to identification of MCKD dominant families. Three genes predisposing to dominant MCKD, MCKD1, MCKD2 and MCKD3 and have been localized to chromosome 1q21, 16p12-13 and 1q41 respectively. With the intention of a correctly diagnostic in our MCKD families we have evaluated the data clinical and carried out genetic studies in each one of them. In thirty-seven families with apparent autosomal dominant nephropathy, clinical findings in more than 80 individuals were collected and evaluated. Haplotype analysis for ten families was performed to MCKD1 and ten to MCKD3. We reported the difficulties establishing the diagnosis of MCKD in these families only by clinical criteria. These families show a wide range of age of disease onset. Gout and hypertension were common, and some patients presented symptoms of salt wasting. Based on haplotype analysis study, linkage was shown to the MCKD1 locus for four families and MCKD3 locus for none of the analysed families.

Mutation screening of at least 1 patient in candidate region of locus 1 was performed in eight different genes selected based in two key criteria: renal expression and some functional feature that can include in the same uromodulin pathway. Several changes was detected in almost genes, but all of them was excluded as candidate gene in MCKD1, except two genes that showed important changes: a stop codon in ADAM15 gene in one family without significant linkage to MCKD1 or MCKD3 and an “in

frame” deletion in EFNA3 gene in one family with interstitial nephropathy associated with mental delay and hepatopathy in recessive inheritance manner. Functional cloning was used to found candidate genes in MCKD families.

MAL and MAL2 are proteins implied in transcytotic or direct transport of newly synthesized proteins from endoplasmic reticulum to Golgi networks and basolateral or apical membrane in polarized epithelial cells. A great variation in apical distribution of MAL and MAL2 proteins was observed in No-UMOD group, no changes were detected in other renal diseases as autosomal dominant polycystic kidney disease or recessive polycystic kidney disease. These results made us to suspect a direct relation between MAL and MAL2 proteins and MCKD, perhaps related wit uromodulin transport to apical surface. Mutational screening was performed in both genes but no changes were detected as pathogenic changes.

Resumen.

La enfermedad renal quística medular (cuyas siglas en ingles son MCKD) junto con la nefronoptosis (NPH) son incluidas en un mismo grupo de nefritis túbulo-intersticial conocido como complejo NPH-MCKD. Aunque la MCKD y NPH comparten características morfológicas se diferencian en diversos aspectos. La variante de la enfermedad más común es la NPH juvenil recesiva, con debut en la infancia e insuficiencia renal crónica terminal (IRCT) en la segunda década de vida. La MCKD es una condición dominante con identificación más tardía y que desemboca en IRCT como media en la quinta década de vida, siendo la hiperuricemia, hipertensión arterial y artritis gotosa las manifestaciones comúnmente asociadas.

En un principio ambas entidades, MCKD y NPH eran consideradas como enfermedades distintas, pero posteriormente se sugirió que realmente se trataba de la misma enfermedad, ya que compartían las mismas manifestaciones clínico-patológicas. Esta idea unificadora fue posteriormente eliminada debido a la identificación de familias que mostraban un patrón de herencia de tipo autosómico dominante, mientras que otras mostraban un patrón autosómico recesivo.

En la MCKD existen al menos tres genes distintos implicados responsables de la MCKD1, MCKD 2 y MCKD3 localizados en los cromosomas 1q21, 16p12-13 y 1q41 respectivamente. Con la intención de diagnosticar nuestra cohorte de familias MCKD correctamente, se han contrastado los datos clínicos disponibles con estudios genéticos en cada una de ellas. En treinta y siete familias se ha visto la existencia de una nefropatía autosómica dominante y se han recolectado y evaluado más de 80 individuos afectados y no afectados. El estudio mutacional del gen UMOD identificó 4 familias con mutación en el gen, con ligamiento al locus 2, y se efectuó un análisis de haplotipos para los loci 1 y 3 en 10 familias distintas. Se ha visto las enormes dificultades que entraña el diagnóstico basado tan sólo en criterios clínicos, estas familias muestran un amplio rango de edad de debut. La presencia de gota e hipertensión son comunes y algunos pacientes mostraban síntomas de pérdida salina. El análisis de haplotipos no reveló ninguna familia con ligamiento significativo al locus 1 y dos excluyeron ligamiento al locus 3 en ocho familias analizadas.

Se ha hecho una búsqueda mutacional en al menos un paciente afecto de cada familia en 9 genes distintos seleccionados en base a dos criterios principales: expresión renal y características funcionales que los puedan incluir en la misma ruta de biosíntesis que la uromodulina. Se han encontrado diversos cambios en casi todos los genes, pero han sido excluidos como candidatos en MCKD1 excepto dos genes en los que se han identificado dos cambios severos: un codón de parada prematuro en el gen ADAM15 en una familia en la que no se ha podido determinar el ligamiento ni al locus 1 ni al locus 3 y una delección “in frame” en homocigosis en el gen EFNA 3 en una familia con nefropatía intersticial esporádica con retraso mental y hepatopatía.

Se usó la estrategia de búsqueda de genes candidatos funcionales para identificar nuevos loci en las familias MCKD. MAL y MAL2 son proteínas implicadas en el transporte transcitótico o directo de proteínas de nueva síntesis desde el retículo endoplásmico al Golgi y hacia la membrana basolateral o apical en células epiteliales polarizadas. Se ha visto una gran variación en la distribución apical de MAL y MAL2 en el grupo No-UMOD, mientras que no se han detectado cambios significativos en otras enfermedades renales como poliquistosis autosómica dominante o poliquistosis autosómica recesiva. Estos resultados nos han hecho sospechar una relación directa entre MAL y MAL2 y MCKD, quizás porque podrían estar implicadas en el transporte de la uromodulina hacia la superficie apical de la célula. Se ha realizado una búsqueda de mutaciones en ambos genes y se han identificado una serie de cambios nucleotídicos pero ninguno cosegregaba con la enfermedad.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. EL COMPLEJO NPH-MCKD

La primera descripción de la Enfermedad Renal Quística Medular, cuyas siglas en inglés son *MCKD* (*Medullary Cystic Kidney Disease*), fue realizada en 1944 por *Thorn GW y colaboradores* ⁽¹⁾ en un estudio en el que se hablaba de la enfermedad bajo el término “*Nefritis Perdedora de Sal*”.

Se trata de una enfermedad detectada principalmente en Norte América y Europa, aunque con baja frecuencia. Actualmente existen unas 60 familias descritas en la literatura, se estima una afectación de 1:10000 nacidos vivos, lo que la clasifica como una enfermedad poco frecuente.

La *MCKD* junto con la Nefronoptosis (*NPH*), constituyen un grupo heterogéneo de nefritis túbulo-intersticial heredada, siendo tratadas durante mucho tiempo como un único complejo *MCKD-NPH*. Ambas enfermedades comparten diversas características clínicas, entre las que se encuentran: poliuria, polidipsia y anemia; una patología macroscópica con quistes presentes en el borde córtico-medular, y con una histología renal en la que destaca atrofia tubular, fibrosis intersticial e infiltración celular. Por ello, ambos términos han sido usados indistintamente para referirse a la Nefropatía Intersticial.

En 1945, *Smith CH y Graham YB* ⁽²⁾ describen el caso de una niña de 8 años que presenta anemia refractaria, hipostenuria y uremia, presentándolo como Enfermedad Renal Quística Medular Congénita, en la que se detectan quistes a nivel medular. A partir de este primer caso, surgieron muchos otros donde se describían pacientes con un cuadro clínico similar y con presencia de quistes en la médula renal. En 1962 ⁽³⁾, *Strauss MB* edita una revisión de 18 pacientes con fallo renal, anemia, pérdida de sodio y quistes medulares.

En 1951 ⁽⁴⁾ *Fanconi G. y colaboradores* hacen referencia a una enfermedad renal, con anemia, poliuria e hipostenuria, con lesiones túbulo-intersticiales e insuficiencia renal que afectaba a niños de entre 4 y 14 años. Los quistes medulares no estaban presentes en ninguno de ellos, por lo que denominó a esta enfermedad como *Nefronoptosis Juvenil Familiar (NPH)*. La presencia de nefritis túbulo-intersticial difusa

con un cuadro de “inferioridad constitucional del tejido renal” lleva a Fanconi a usar el término *NPH* restringido sólo a este cuadro clínico descrito. Por lo que *NPH* y *MCKD* originariamente se trataban como enfermedades distintas. Así *NPH* se usaba para hermanos jóvenes afectados con un fenotipo quístico asociado de forma esporádica en Europa, y *MCKD* en *EEUU* para las formas del adulto con antecedentes familiares.

La controversia comenzó por parte de algunos autores al afirmar que *NPH* y *MCKD* eran realmente una única entidad, puesto que se detectaron casos de *NPH* en los que se podían observar los quistes medulares ^(5, 6). La elevada incidencia detectada en *NPH* frente a la detectada en *MCKD*, el encontrar niños con cuadro clínico de *MCKD* y con insuficiencia renal a los 10 años y la dificultad del establecimiento de criterios de diagnóstico para separar ambas enfermedades, forzaron a muchos autores a concluir que realmente se trataba de una misma enfermedad ⁽⁵⁾.

El concepto de *NPH-MCKD* fue nuevamente retomado cuando *Goldman SH* y colaboradores, 1966 ⁽⁷⁾ describen una familia compuesta por 5 generaciones con 17 afectados con una edad media de debut de 23 años y con insuficiencia renal en torno a los 25 años. En 1972 *Gadner KD*. ⁽⁸⁾ describe dos familias distintas con quistes medulares con debut a los 25 años como media en una y 35 años en la otra.

Posteriormente la divulgación de nuevas familias con transmisión vertical de padres a hijos, de acuerdo con un patrón de herencia de tipo autosómico dominante, frente a las formas esporádicas familiares compatibles con un patrón de herencia autosómico recesivo, permiten que se empiece a pensar en que realmente se trate de entidades con orígenes distintos, al menos desde el punto de vista genético. Además, al evaluar con más precisión la edad de fallo renal, se pudo comprobar que realmente las formas recesivas eran mucho más tempranas que las dominantes. Por ello, y aunque la similitud fenotípica es muy grande, se sugiere que se utilice la terminología *MCKD* para la transmisión dominante con manifestación en edad adulta y *NPH* para la transmisión recesiva pediátrica-juvenil.

Actualmente se considera que la *NPH* es una enfermedad de herencia autosómica recesiva que afecta principalmente a niños (de 10-12 años de edad) con una rápida evolución a la insuficiencia renal en la segunda década de vida ⁽⁹⁾. Aunque existen similitudes fenotípicas, se reconoció más tarde que *la Enfermedad Renal*

Quística Medular y la *Nefronoptosis* eran entidades clínicas distintas y fue en el año 1998 cuando el término *MCKD* se estableció para pacientes con debut en edad adulta y herencia autosómica dominante y *NPH* para formas juveniles con debut en edad infantil y transmisión de la enfermedad recesiva. Todo gracias a la identificación del primer gen responsable de la Nefronoptosis tipo I, pudiendo así comprobarse que la herencia era de tipo recesiva ⁽¹⁰⁾.

Tabla 1.1. Complejo MCKD-NPH. Semejanzas y diferencias fenotípicas del complejo MCKD-NPH.

	NEFRONOPTISIS	ADMCKD
CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS COMUNES		
Síntomas Clínicos		Poliuria
		Polidipsia
		Anemia
Macroscopía		Quistes en el borde córtico-medular
Histología		Atrofia Tubular
		Fibrosis Intersticial
		Infiltración Celular
CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS/GENOTÍPICAS DIFERENTES		
Modo de Herencia	Autosómica Recesiva	Autosómica Dominante
Edad de ESRD	De Infancia a Adolescencia	Adulto (3ª-5ª década de vida)
Manifestaciones Extrarrenales	Anormalidades Retinales (Síndrome Senior-Loken y apraxia óculo-motora tipo Cogan)	Gota
		Hiperuricemia
Genes Responsables	NPHP1	UMOD
	INVS	...
	NPHP3	...
	NPHP4	...
Proteínas	Nefrocistina 1	Uromodulina
	Inversina	...
	Nefrocistina 3	...
	Nefrocistina 4	...

1.2. PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD RENAL QUÍSTICA MEDULAR

La patogénesis de la *MCKD* no es todavía del todo clara. Se cree que el origen de la enfermedad podría estar provocado por las lesiones renales y los defectos tubulares asociados a la inflamación intersticial y la fibrosis progresiva. Se considera la posibilidad de que la enfermedad pueda ser resultado de la toxicidad renal provocada por la acción de una sustancia circulante, aunque no existen muchas evidencias que prueben esta hipótesis ⁽¹¹⁾. El hecho de que no se haya visto recidiva de la enfermedad tras el trasplante renal descarta también un efecto sistémico. Nuevos avances en la genética molecular de *MCKD*, tales como la identificación de los genes causantes y la funcionalidad proteica de las rutas implicadas podrían permitir el avance en los conocimientos sobre la patogénesis de la enfermedad, y así poner fin a su progresión hacia la insuficiencia renal crónica terminal y mejorar la calidad de vida de los pacientes. De momento se cree que los productos del gen/es responsables de *MCKD* podrían formar parte de una compleja vía de señalización en la que están implicadas proteínas que juegan un papel importante en la adhesión focal debido a su probable interacción con la nefroquistina y otros ligandos ⁽¹²⁾.

1.3. PATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD RENAL QUÍSTICA MEDULAR

La característica macroscópica más evidente de la enfermedad además de la existencia de riñones de pequeño tamaño, es la presencia de quistes de tamaños variables, primariamente localizados en la región córtico-medular y/o en la médula. La microscopía óptica usualmente revela una nefritis túbulo-intersticial difusa, con áreas focales de atrofia tubular, fibrosis intersticial e infiltración de células inflamatorias. Grupos de túbulos atróficos pueden alternarse con hipertrofia variable y túbulos dilatados marcando un engrosamiento de la membrana basal tubular. Estos túbulos atróficos están normalmente rodeados por tejido intersticial fibrótico y acompañados por un escaso infiltrado inflamatorio. Los glomérulos son casi siempre normales, algunos están completamente escleróticos y otros muestran un grado variable de fibrosis peri-glomerular. La *MCKD* histológicamente es indistinguible de la *NPH* juvenil, sin embargo en muchos registros que conciernen a la *MCKD*, el engrosamiento de la membrana tubular basal está ausente o es casi indetectable ^(13, 9).

1.4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD RENAL QUÍSTICA MEDULAR

1.4.1. Principales lesiones renales

La *MCKD* es una enfermedad heterogénea en algunos aspectos clínicos, incluyendo la edad de aparición de los primeros síntomas, la presencia de quistes en el riñón (*Figura 1.4.1*) y la progresión a IRCT. La *MCKD* parece ser una entidad que se presenta en edades tardías de la vida, con una media de edad de aparición de la enfermedad de aproximadamente 28 años.

Figura 1.1. Riñón con múltiples quistes medulares de pequeño tamaño.



La IRCT se manifiesta entre la tercera y quinta década de vida, o incluso más tardíamente ^(13, 9). Sin embargo, se han descrito casos de *MCKD* en jóvenes y en la infancia ⁽¹⁴⁾. Es típica también la presencia de variación intra-familiar en cuanto a la edad de aparición de los síntomas, pudiendo existir formas adultas o jóvenes dentro de una misma familia. La patología puede ser clínicamente evidente durante la infancia o adolescencia en algunos pacientes jóvenes y de aparición tardía en adultos ⁽¹¹⁾. Estos datos sugieren que no se puede establecer una edad límite de aparición clínica ya que la enfermedad puede ser detectada en todos los intervalos de edad. Por esta razón, la edad de aparición de la enfermedad, tradicionalmente enfatizada como la principal diferencia entre *NPH* juvenil y *MCKD* adulta, no debería ser tomada en cuenta para valorar el diagnóstico de *MCKD*.

El primer signo de la enfermedad consiste en una reducción de la capacidad de concentrar orina, que puede ser provocada por una disfunción renal encontrada de forma precoz, y preceder al declive del índice de filtración glomerular. Las anormalidades en la orina están limitadas a esta incapacidad de concentrar la orina y a la pérdida de sal. La proteinuria está ausente o es casi inexistente, pudiendo detectarse pocos elementos formes en el sedimento de orina. Los síntomas clínicos surgen tras la disminución de la concentración urinaria surge la poliuria acompañada de polidipsia. No se ha detectado ninguna anormalidad fisiológica en el funcionamiento del túbulo proximal, como por ejemplo, glucosuria, hipofosfatemia o aminoaciduria excesiva.

En estadios avanzados, los hallazgos clínicos describen una insuficiencia renal progresiva acompañada de anemia, acidosis metabólica y síntomas de uremia junto con náuseas, anorexia y debilidad. En fases tardías muchos pacientes desarrollan hipertensión, sin embargo, puede estar ausente en pacientes con el síndrome perdedor de sal. La historia natural de *MCKD* se caracteriza por una lenta progresión al cuadro de IRCT.

Una vez iniciada la insuficiencia crónica terminal el único tratamiento existente para los pacientes es la diálisis o en el trasplante renal. Se ha visto que el daño tubular, no recurre en aquellos pacientes que han sido trasplantados ⁽¹³⁾.

1.4.2. Principales lesiones extrarrenales

Las principales lesiones extrarrenales asociadas a la Enfermedad Renal Quística Medular son gota y/o hiperuricemia, frecuentes en familias afectadas. En 1978, *Thompson y colaboradores* ⁽¹⁴⁾ observaron la presencia de hiperuricemia, artritis gotosa aguda y enfermedad renal quística medular con IRCT en tres pacientes de una familia con dos generaciones. Tanto la hiperuricemia como la artritis gotosa se manifestaron siendo adolescentes, pero el fallo renal surgió a edades ya muy avanzadas. En 1982, *Burke y colaboradores* ⁽¹⁵⁾ estudiaron una larga familia con *MCKD* con gota asociada y epilepsia. La edad de diagnóstico de los seis pacientes de la familia varió entre 4 y los 32 años, y la edad de muerte por insuficiencia renal o entrada en diálisis estuvo entre los 7 y los 48 años.

1.5. EL COMPLEJO NPH-MCKD/FJHN

La importancia de la asociación de la nefropatía intersticial familiar con quistes medulares con hiperuricemia y/o gota no está todavía bien definida ^(13, 16). Se puede observar una fuerte similitud en el fenotipo entre la *MCKD* asociada a hiperuricemia y gota y la Nefropatía Juvenil Hiperuricémica Familiar (*FJHN*), otra nefropatía túbulo-intersticial renal autosómica dominante, con penetrancia y progresión hacia el fallo renal, cuya bioquímica está marcada por una hiperuricemia resultante de una fuerte reducción fraccionaria de ácido úrico en la sangre, con presencia o no de gota ⁽¹⁷⁾.

Actualmente existe una gran tendencia a clasificar la *MCKD* con hiperuricemia y/o gota y la *FJHN* basándose en características tales como la presencia de quistes medulares en pacientes con *MCKD* y la edad juvenil de aparición del fallo renal en familias con *FJHN*. Sin embargo, cabe destacar la existencia de casos donde se han observado estas características en ambas complicaciones, es decir, casos de *MCKD* sin quistes medulares con aparición de fallo renal en la fase juvenil, y por otro lado, presencia de quistes medulares y reducida excreción fraccionaria de ácido úrico en *FJHN* (aspectos clínicos típicos de *MCKD*) ^(18, 19). Finalmente, la fibrosis intersticial, la atrofia tubular y la infiltración del intersticio por células inflamatorias son características relevantes compartidas por ambas.

1.5.1. Biología Molecular del complejo NPH-MCKD

1.5.1.1. Biología Molecular de NPH

En la década pasada, las nuevas estrategias utilizadas por la genética molecular potenciaron la clasificación de las distintas entidades permitieron la separación del complejo *NPH-MCKD*. La evidencia de que la Enfermedad Autosómica Recesiva Juvenil Familiar (*NPHP*) y la autosómica dominante *MCKD* eran enfermedades distintas fue definitiva a partir de la localización de los genes implicados en la patogénesis. A principios de los 90 se identificó el primer gen responsable de la *NPH* ⁽²⁰⁾. Mediante el análisis de ligamiento, utilizando marcadores microsatélite distribuidos por el todo el genoma, se acotó una región en el cromosoma 2q12-q13 donde se localizó

un gen, NPHP1, con una larga delección de 250 Kb en homocigosis en un 80% de los pacientes ⁽²¹⁾.

Poco después se localizó un segundo locus para *NPH* en el cromosoma 9q22-31 mediante estudios de clonación posicional en una gran familia israelí ⁽²²⁾. Esta segunda forma de nefronoptosis, llamada NPHP2, se caracteriza por una entrada extremadamente precoz en diálisis de los pacientes (la edad media de IRCT está en los 3 años).

Un tercer tipo, NPHP3, fue identificado en una familia venezolana. Se localiza en el cromosoma 3q21-22, y es responsable del 10% de los casos de NPHP ⁽²³⁾. La NPHP3 se presenta en la adolescencia, con un cuadro de desarrollo de IRCT a los 19 años de edad.

Finalmente, en el 2002, se identificó el último locus en el cromosoma 1p36 para una cuarta forma de nefronoptosis, NPHP4 ⁽²⁴⁾. El gen causante de esta última forma fue identificado y descrito por dos grupos independientes ^(25, 26).

1.5.1.2. Biología Molecular de MCKD

En el año 1998 se publica un primer trabajo que impulsa el progreso en los estudios genéticos de MCKD para centrarse principalmente en el descubrimiento del gen causante de esta enfermedad. Mediante estudios de ligamiento se excluyó ligamiento al locus 1 identificado para *NPH* en una larga familia chipriota ⁽¹⁹⁾. La edad media de IRCT era de 62 años, y como rasgo fenotípico importante destacaba la presencia de hiperuricemia y gota en alguno de sus pacientes. Posteriormente se identificó el primer locus implicado en la MCKD ⁽²⁷⁾ en dos familias chipriotas con hiperuricemia y gota. El hecho de que existiesen familias que no ligaban a este locus 1 motivó la realización de un amplio estudio de mapeo genético del gen responsable de MCKD tipo 2 en todo el genoma humano utilizando 358 marcadores microsatélites fluorescentes altamente polimórficos ^(28, 29) que cubrían todos los cromosomas autosómicos.

Esta estrategia fue utilizada para identificar las tres regiones cromosómicas responsables de la enfermedad y conocidas hasta el momento. Tras la localización del locus 1 se identificó una nueva región que ligaba con la enfermedad en el cromosoma

16, donde más tarde se identificó en una familia italiana compuesta por cuatro generaciones distintas ⁽³⁰⁾. El gen responsable de la enfermedad fue localizado al poco tiempo de acotar la región, se encontraron una serie de cambios conservativos en la proteína uromodulina, producto del gen *UMOD*, que cosegregaban con la enfermedad.

Finalmente, en 2006 se identifica un tercer locus en la región 1q41 con fenotipo similar a las formas ya descritas ⁽³¹⁾. En el mismo estudio se pone de manifiesto la existencia de más loci implicados en la enfermedad puesto que se describen una serie de familias diagnosticadas como MCKD que no ligan ni al locus 1 ni al 3.

1.6 VARIACIÓN GENÉTICA Y METODOLOGÍA PARA SU DETECCIÓN

La variación genética derivada de cambios en el ADN puede medirse usando diferentes técnicas, pudiendo encontrarse variaciones que van desde una simple sustitución de un nucleótido, que representa el tipo más frecuente de cambio y que puede ser detectado a través del estudio de los análisis de los *SNPs* (*Single Nucleotide Polymorphisms*), hasta variaciones en las que están implicadas un mayor número de nucleótidos como los *VNTRs* (*Variable Nucleotidic Tandem Repeat*) o *STRs* (*Short Tandem Repeat*).

La detección de estas variaciones en la secuencia del ADN es posible gracias al desarrollo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) descrita por Mullis y coautores en 1986 ⁽³²⁾. Se basa en la amplificación de elevadas copias de un fragmento específico, a partir de una pequeña cantidad de ADN molde mediante una reacción enzimática catalizada por un enzima, la ADN polimerasa. Se precisa para la síntesis un par de oligonucleótidos o cebadores, pequeñas secuencias de ADN de entre 18-30 nucleótidos, complementarias a las regiones flanqueantes 5' y 3' del fragmento que se desea amplificar.

Un marcador molecular debe reunir una serie de características para maximizar su utilidad, entre las que destacan una elevada distribución por todo el genoma, elevado grado de polimorfismo, rapidez en la técnica y gran reproductibilidad.

1.6.1. Principales tipos de marcadores de ADN y métodos de detección

1.6.1.1. *SNP (polimorfismo de base única)*

Se trata de un polimorfismo que se caracteriza por la presencia de un nucleótido distinto en una posición determinada, por ejemplo sustituciones, deleciones o inserciones de un único nucleótido. La mayoría de estos polimorfismos presentan sólo dos alelos (bialélica), y por ello son referidas algunas veces como marcadores bialélicos. Con la presencia únicamente de dos alelos, la máxima heterocigosidad esperada para cada *SNP* es de tan sólo un 50%, por lo que resultan menos informativos que las regiones satélites de ADN (minisatélites y microsatélites), las cuales generalmente presentan múltiples alelos y sus valores de heterocigosis superan el 70%. Aunque muchos de los *SNP*'s se localizan en regiones no codificantes, un número importante de estas mutaciones se sitúan en genes y van asociados a enfermedades.

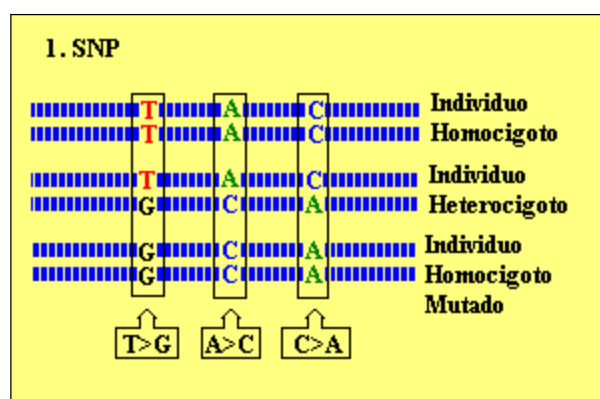


Figura 1.2. Representación gráfica de un *SNP* (Single Nucleotide Polymorphism).

Su alta frecuencia en el genoma y su baja tasa de mutación, hacen que se constituyan como elementos deseables para la construcción de mapas genéticos. En el caso del genoma humano, donde mayoritariamente se han estudiado los *SNP*'s, se estima que exista un *SNP* con una heterocigosis por encima del 30% cada 1.3 kb⁽³³⁾.

1.6.1.2. Minisatélites o Número de Secuencias de Tamaño Variables (VNTR)

Los VNTR son repeticiones al azar en tándem de 10 a 60 pb, altamente polimórficos y con elevada tasa de heterocigosidad en las poblaciones. Se encuentran generalmente en regiones no codificantes y dispersas por todo el genoma ⁽³⁴⁾.

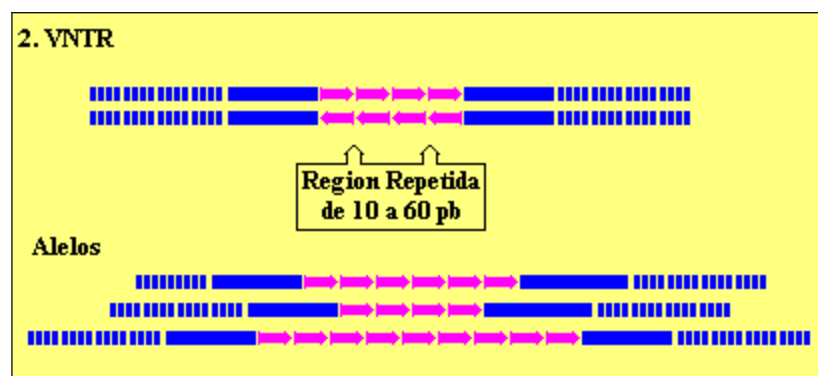


Figura 1.3. Representación de un polimorfismo VNTR.

1.6.1.3. Microsatélites o Secuencias Repetidas Cortas en Tandem (STR)

Los microsatélites son segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pares de bases (pb), que se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma.

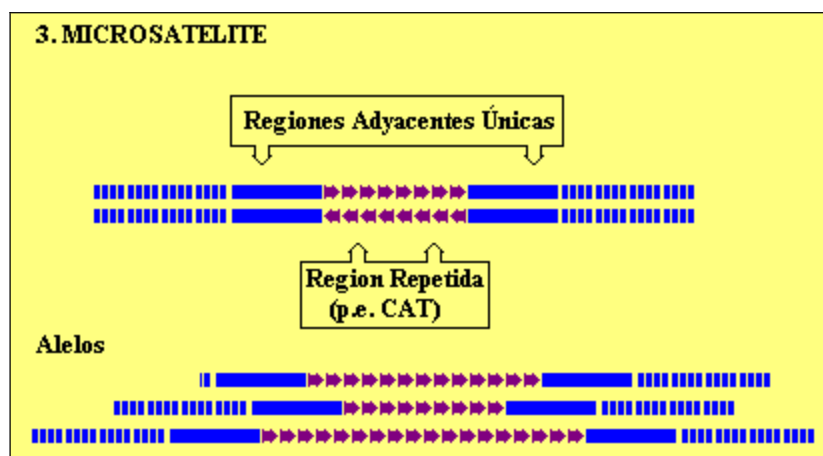


Figura 1.4. Representación gráfica de un microsatélite con distintos alelos.

Son considerados como una poderosa herramienta para estudios genéticos presentando ventajas como: elevado grado de polimorfismo, herencia

mendeliana simple, codominancia (pudiéndose diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos), fáciles de medir y analizar, fiabilidad del 100%, repetitivos y automatizables. Estos marcadores se encuentran generalmente en regiones no codificantes del genoma y distribuidos uniformemente ⁽³⁵⁾.

1.6.1.4. Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)

Es una de las primeras técnicas descritas ⁽³⁶⁾ desde la aparición de la PCR, y consiste en visualizar las diferencias a nivel de la estructura del ADN, basándose en el uso de enzimas de restricción que cortan el ADN en sitios donde se encuentra una secuencia específica de nucleótidos.

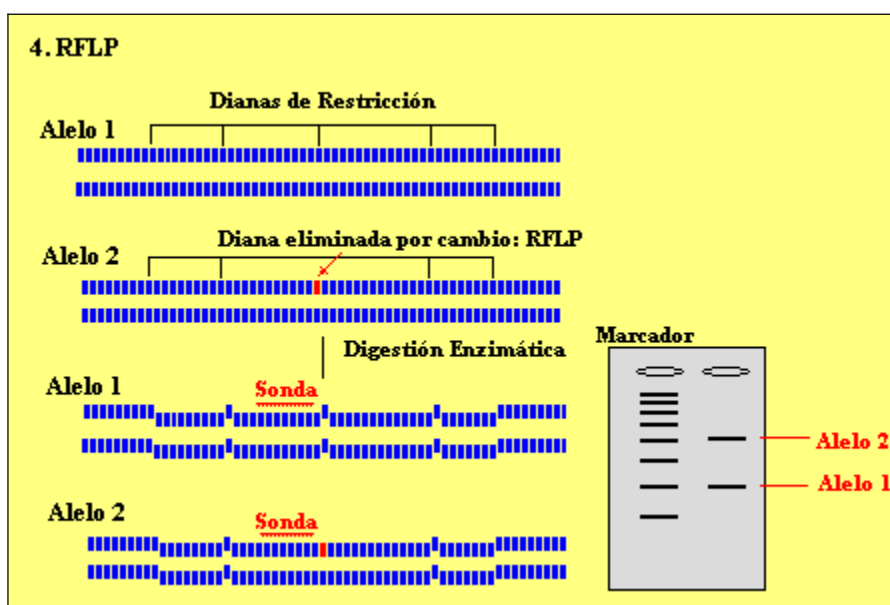


Figura 1.5. Representación gráfica de un marcador RFLP y su detección en un gel tras la digestión enzimática.

La identificación de los fragmentos (*RFLPs*) requiere del uso de geles de electroforesis que permitan separar los fragmentos que difieren en tamaño.

La limitación de esta técnica es que únicamente identifica dos alelos por *locus*, por lo que la variabilidad obtenida es reducida. Otra limitación es que la aproximación con *RFLPs*, para la búsqueda de polimorfismo en productos de *PCR* no es metodológicamente efectiva al 100%, ya que muchos *SNPs*

potenciales podrían no cambiar un sitio de restricción, y por tanto no serían detectados por ella ⁽³⁷⁾.

1.6.1.5. Polimorfismo Amplificado Aleatoriamente (RAPD)

Consiste en el uso de oligonucleótidos o cebadores de pequeño tamaño que a través de una reacción de *PCR* con bajas temperaturas de anillamiento o hibridación amplifica una serie de fragmentos de amplio espectro a partir de ADN molde.

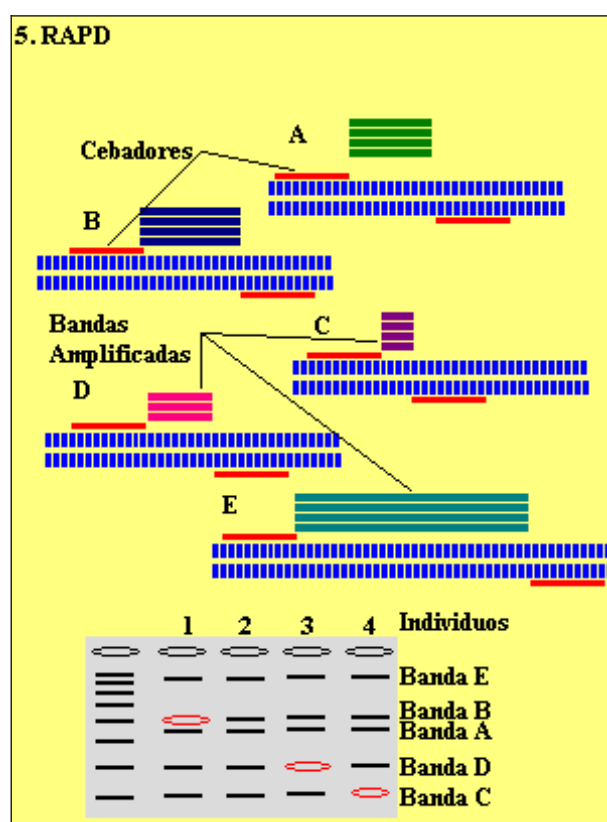


Figura 1.6. Representación gráfica de un marcador RAPD y su detección en un gel tras su amplificación.

La técnica consiste en detectar fragmentos polimórficos, para posteriormente poder ser mapeados.

Una de las principales limitaciones es la baja reproductibilidad de los análisis junto con la necesidad de usar un gran panel de *RAPDs*, lo que supone un elevado valor económico y un laborioso trabajo analítico. Además, al tratarse de

un marcador genético dominante no se puede discriminar la existencia de heterocigotos subestimando la cantidad de polimorfismos existentes.

1.6.2. Marcadores microsatélites

Los marcadores microsatélite constituyen una de las herramientas más utilizadas en la biología molecular. Se encuentran distribuidos a lo largo de todo el genoma eucariota, con baja frecuencia en regiones codificantes y en telómeros y su presencia en estas regiones se ha descrito asociada a enfermedades ^(38, 39, 40). Sin embargo, aún se desconoce el significado funcional de estas secuencias, y la hipótesis más aceptada señala que pueden estar relacionados con el empaquetamiento y la condensación del ADN cromosómico. Debido a sus ventajas, el uso de microsatélites ha tenido un gran impacto en el estudio de la genética desde su descubrimiento en 1989 ^(41, 42, 43).

El análisis con microsatélites involucra la detección de fragmentos específicos de ADN con un tamaño específico para cada alelo en pb en cada una de las regiones ⁽⁴⁴⁾. Su uso es ampliamente aplicable a distintas estrategias en las que la variabilidad genética está implicada, utilizándose frecuentemente en medicina forense, pruebas de paternidad, construcción de mapas genéticos e identificación de genes de interés (*QTLs*). Son utilizados en estudios de genética poblacional ya que permiten estimar los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y analizar las relaciones genéticas existentes entre ellas.

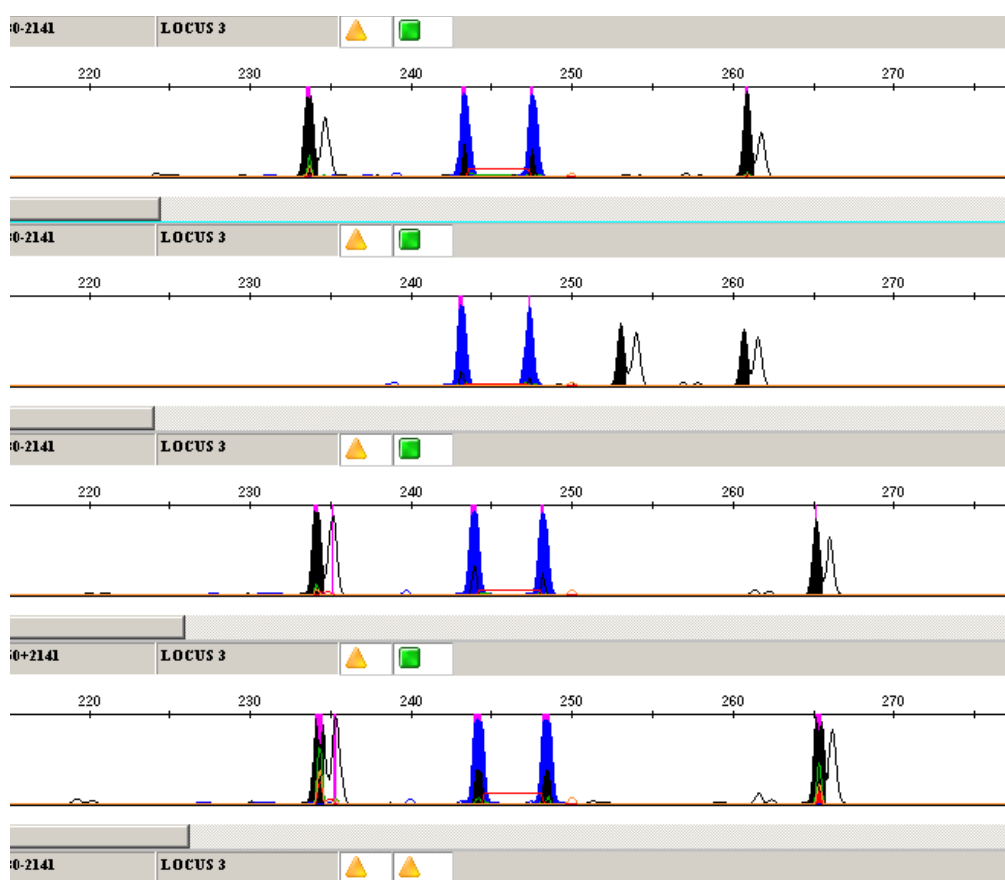
Una de las estrategias en las que su uso resulta fundamental es la construcción de *mapas genéticos* y genómica comparativa, que permite la construcción de mapas de ligamiento más completos y detallados así como la identificación de genes de interés.

Todos los marcadores pueden ser utilizados para mapas de ligamiento, sin embargo se requiere que los alelos se segreguen de forma independiente y puedan ser monitorizados a través de pedigrís. La descendencia puede ser informativa si los progenitores son doble heterocigotos. Los *loci* situados en cromosomas distintos pueden recombinarse libremente durante la gametogénesis parental hasta un 50% (segregación independiente); mientras que si se encuentran en el mismo cromosoma, recombinan con una frecuencia que oscila entre 0-50% dependiendo de la distancia en centimorgans

(cM) entre ellos. Así, un mapa genético bien surtido de marcadores se convierte en una herramienta muy útil para identificar genes responsables de enfermedades.

La técnica se basa principalmente en la búsqueda de asociación entre varios alelos, en cualquiera de los marcadores, segregando en poblaciones afectas, para identificar regiones del genoma donde es más probable que se encuentre el gen responsable.

Figura 1.7. Análisis de marcadores microsatélite. Cuatro pacientes distintos con dos marcadores distintos (azul y negro), todos ellos heterocigotos.



1.6.3. Ligamiento y Recombinación

Se llama **ligamiento génico** a aquel grupo de genes ubicados en un cromosoma y que por lo tanto, no se segregan en forma independiente. Cuanto más cerca se encuentren estos genes en un cromosoma, menor va a ser la probabilidad de que se

formen quiasmas entre ellos, por lo que, **genes estrechamente ligados se heredarán juntos**. Al conjunto de *loci* (lugar que ocupa un gen) situados en un mismo cromosoma se le llama **grupo de ligamiento**. Por lo tanto existen tantos grupos de ligamiento como dotaciones cromosómicas haploides. Cuando los genes se encuentran más distantes, puede suceder el fenómeno de **recombinación genética** (uno de los mecanismos biológicos de individuos con reproducción sexual, que generan variación). Para poder construir mapas de ligamiento, se debe conocer la distancia que existe entre loci adyacentes. Esta distancia es una función de la frecuencia del “*crossing-over*” meiótico, caracterizado por los eventos de recombinación que ocurren entre estos genes.

Para comprender la relación que existe entre quiasmas y entrecruzamientos, se debe considerar que por cada quiasma que se forma, son dos las cromátidas involucradas, es decir las cromátidas homólogas. Cuando se forma un quiasma entre dos loci génicos, sólo la mitad de los productos meióticos serán de tipo recombinante.

$$\% \text{ Quiasmas} = 2(\% \text{ Entrecruzamiento})$$

El porcentaje de recombinación se usa, entonces, como una estima de la distancia entre loci de un cromosoma y se corresponde a 1cM o unidad de mapa. 1cM = 1.000.000 pb.

La penetrancia es la probabilidad, dentro de una familia, de sufrir los síntomas clínicos de la enfermedad en aquellos miembros que portan una mutación en el gen responsable. Se ha comprobado en diferentes estudios familiares que la penetrancia no es el 100%, es decir, que no en todos los casos en que se encuentra una mutación en el gen van a aparecer síntomas clínicos a lo largo de su vida.

1.6.4. Aplicación del Mapeo Genético

El **mapeo génico** permite conocer la relación de ligamiento entre genes es decir, la relación de proximidad o cercanía entre ellos. Dos genes estrechamente ligados se heredarán juntos.

El análisis de familias permite realizar el seguimiento de una característica heredable, por ejemplo una enfermedad, mediante marcadores genéticos, testados por

segregación en sucesivas generaciones, realizando el seguimiento del o los alelos ligados al gen de interés (Figura 1.6.2).

El haplotipo resulta de la combinación de alelos de dos o más loci sobre un mismo cromosoma. Debido a las cortas distancias físicas entre los *loci*, éstos pueden heredarse como una única unidad. A nivel molecular un haplotipo corresponde a una región específica del genoma donde existen combinaciones de bases particulares identificadas como polimorfismos microsatélite (Figura 1.6.2).

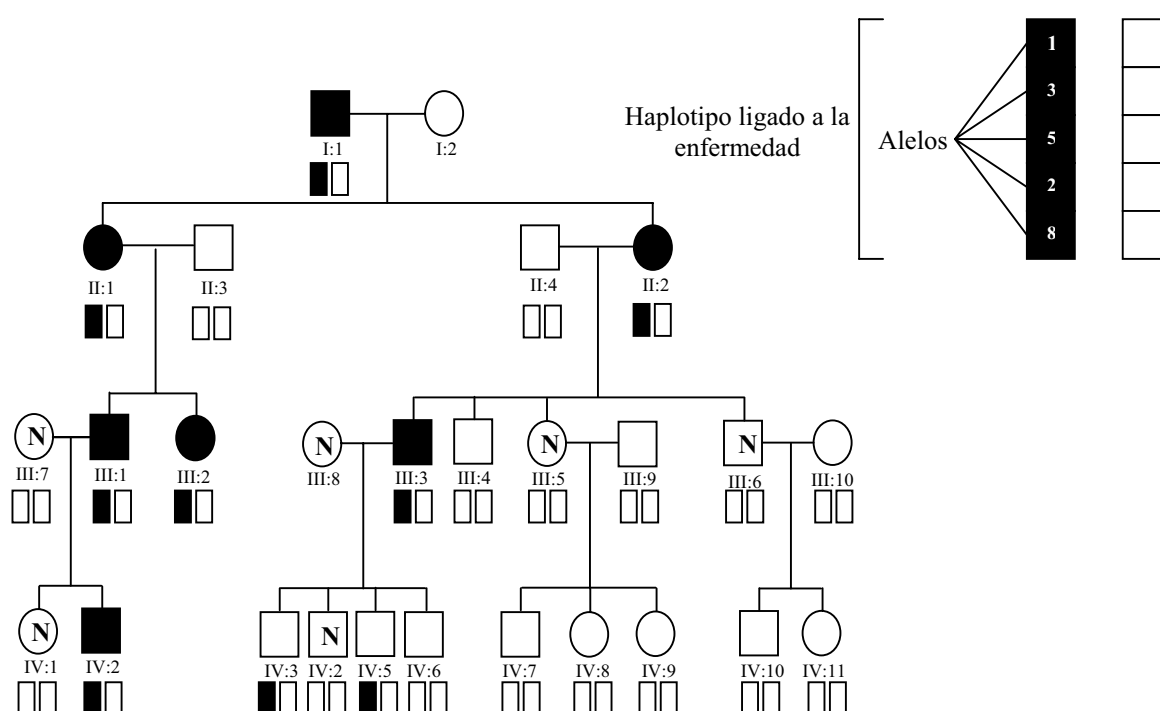


Figura 1.8. Ejemplo de pedigrí familiar con haplotipo ligado a la enfermedad (en negro) en las tres primeras con los alelos 1 3 5 2 8. los círculos representan el sexo femenino mientras que los cuadrados representan el masculino, las figuras rellenas en negro indican individuos afectados de la familia, mientras que los blancos indican manifestación de la enfermedad desconocida. Los círculos o cuadrados con una N en su interior hacen referencia a individuos sanos.

Para conocer los grupos de ligamiento y asignar en él un nuevo marcador altamente polimórfico, debemos utilizar el criterio conocido como **LOD SCORE**. Este se define como el logaritmo en base diez de la relación entre la probabilidad de que los datos obtenidos de los *loci* estén ligados frente a la probabilidad de que no lo estén. Un *LOD Score* >3.0 corresponde a una relación de 1000:1, a favor del ligamiento. Un *LOD Score* de 4.0 presenta una probabilidad de error de solamente 1 en 200.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El objetivo de esta tesis es ahondar en la caracterización clínica, biológica y genética de familias con la Enfermedad Renal Quística Medular Autosómica Dominante (*MCKD*) que permita realizar y ofrecer un diagnóstico correcto y anticipado de la enfermedad, y buscar nuevos genes responsables de la enfermedad. Hasta el momento se ha identificado un único gen (*UMOD*), localizado en el cromosoma 16, que codifica para una proteína conocida como uromodulina o *Tamm-Horsfall protein*. En nuestra población, el gen *UMOD* es responsable tan sólo de un 10% de la enfermedad (se han identificado mutaciones en 4 familias distintas). Como todavía queda un porcentaje superior al 70-80% de familias en las que no se ha detectado el gen se pretende:

En primer lugar identificar las familias de *MCKD* con ligamiento al locus 1 para poder establecer una correlación fenotipo-genotipo que pueda facilitar inicialmente el diagnóstico clínico de la enfermedad.

En aquellas familias con ligamiento positivo al locus 1 se pretende identificar el gen responsable de la enfermedad *MCKD* tipo 1, identificar su producto de expresión y determinar su mecanismo patogénico con el fin de poder retrasar en la medida de lo posible la entrada en diálisis de los pacientes o incluso el desarrollo de nuevas terapias preventivas.

La exclusión de familias con ligamiento a los dos loci descritos implica la existencia de un tercer locus implicado en el desarrollo de la enfermedad. Hasta el momento existe un único trabajo en el que se ha identificado un tercer locus en una única familia belga. Partiendo de los mismos marcadores microsatélites para esta región acotada, se pretende identificar nuevas familias con ligamiento a esta región y localizar un tercer gen relacionado con la Enfermedad Renal Quística Medular tipo 3.

Se han descrito familias sin ligamiento a ninguno de los tres *loci*. Lo mismo sucede en nuestra población, pero no se dispone de un número elevado de individuos para realizar una búsqueda de nuevas regiones por todo el genoma, por ello se recurre a la búsqueda candidatos funcionales. Proteínas que se encuentren en la misma cascada de señalización que la uromodulina (única proteína identificada para el locus 2), implicadas en su biosíntesis, procesamiento, transporte o activación, con expresión

fundamentalmente renal son buenas candidatas. Modificaciones en su estructura podrían alterar su correcta distribución provocando la misma patogénesis que el gen UMOD.

Se pretende llevar a cabo la búsqueda de otros loci implicados en la enfermedad por clonación funcional, es decir, detección de nuevos genes implicados dispersos por todo el genoma en base a su función. Por ello se han seleccionado dos genes distintos localizados en los cromosomas 2 y 8 implicados en el transporte de proteínas GPI desde el aparato de Golgi hasta la membrana apical de forma directa o transcitótica.

***III. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA DE
FAMILIAS CON MCKD Y LIGAMIENTO
GENÉTICO AL CROMOSOMA 1***

3.1. INTRODUCCIÓN

3.1.1. Acotamiento del locus 1 (cromosoma 1q21) de MCKD

El primer paso hacia la diferenciación de la *MCKD* y *NPH* fue la localización del primer gen responsable de la *NPHI* ⁽¹⁰⁾, junto con la identificación del locus responsable de la *MCKD*, permitiendo así demostrar la existencia de alelismo entre ambas enfermedades ^(16, 19). El análisis de ligamiento de dos familias chipriotas permitió la localización de este primer locus en el cromosoma 1, en la región 1q21 ⁽⁴⁴⁾, quedando la región candidata delimitada a un pequeño tamaño de 8 cM flanqueada por los marcadores *DIS498* y *DIS2125*. Ambas familias presentaban el mismo haplotipo asociado a la enfermedad lo que inicialmente hizo pensar en la existencia de un efecto fundador, rasgo típico de territorios de pequeño tamaño como las islas. Posteriormente la localización de una nueva familia judía-iraquí ligada al locus 1 con un haplotipo distinto eliminó la idea inicialmente propuesta de un efecto fundador extendido ⁽⁴⁵⁾. El primer gen candidato fue secuenciado en el año 2001, a la vez que se acotaba la región candidata a 5 cM aproximadamente ⁽⁴⁶⁾, flanqueada por los marcadores *DIS2624* y *DIS2125*. El gen *NPRA* (*natriuretic peptide receptor A/guanylate cyclase A (atrionatriuretic peptide receptor A)*) aparentaba atractivo, además de localizarse en la región candidata y expresarse en el riñón, el hecho de que tuviese función reguladora de la presión sanguínea lo relacionaba con la hipertensión arterial, ⁽⁴⁷⁾ detectada en algunos pacientes. Tras la secuenciación directa de este gen en 5 familias finlandesas se descartó como candidato. Ese mismo año se publicó también su exclusión ⁽⁴⁸⁾, por otro grupo que describió una serie de cambios nucleotídicos pero que no cosegregaban con la enfermedad.

Ese mismo año se publica un nuevo refinamiento cromosómico en una familia inglesa (flanqueado por los marcadores microsatélite *DIS305-DIS2125*), quedando la región acotada a 4 cM. Se secuencian un nuevo candidato, *HAX-1*, la proteína codificada por este gen se ha visto que se asocia con la proteína HS1, sustrato de la familia de proteínas *src* *tirosin-kinasa* y que interacciona con el producto de expresión del gen *PKD2*, la poliquistina 2, proteína mutada en la poliquistosis renal autosómica dominante y con la contractina, proteína de unión a la F-actina, en el que tampoco se encontraron

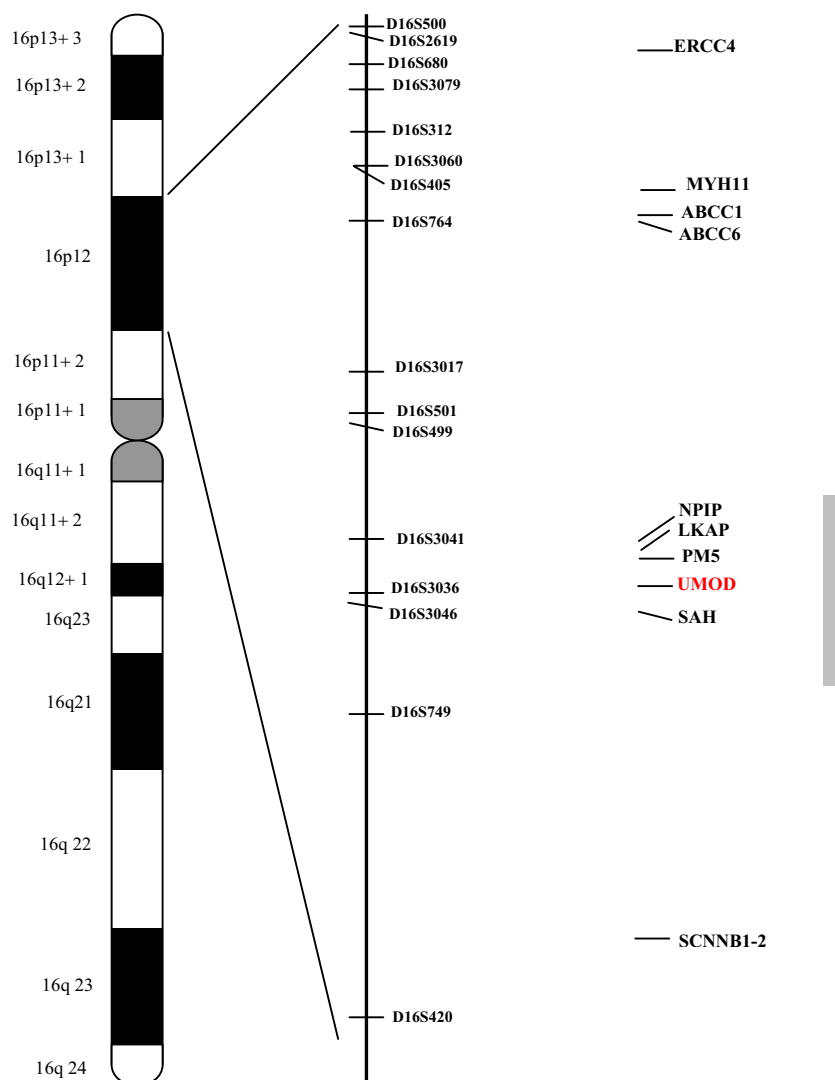
cambios nucleotídicos ⁽⁴⁹⁾. A comienzos de este año se caracteriza a **HAX-1** como el gen responsable de la **Enfermedad de Kostmann o Neutropenia Congénita Severa Autosómica Recesiva** ⁽⁵⁰⁾. Mediante clonación posicional y evaluación del gen candidato por secuenciación directa se identifica una mutación recurrente en homocigosis (**Q190X**) en tres familias distintas afectas por esta enfermedad. Se comprueba el papel protector de la proteína codificada por HAX-1 frente a la apoptosis en células mieloides, actuando como uno de los mayores reguladores de la homeostasis mioide.

3.1.2. Acotamiento del locus 2 de MCKD

Poco después de la localización del locus 1 se identificó el locus 2, responsable de la MCKD tipo 2, en el cromosoma 16p12 en una familia italiana compuesta por 4 generaciones. El fenotipo que presentaba era el típico de MCKD pero acompañado con artritis gotosa e hiperuricemia. La región inicialmente se encontraba flanqueada entre los marcadores D16S500 y SCNN1B1-2, con 10,5 cM aproximadamente ⁽³⁰⁾. Tras el refinamiento de la región en dos familias multigeneracionales se identificaron 4 nuevas mutaciones en heterocigosis en tres familias de FJHN y una familia con MCKD2, quedando así demostrado que ambas enfermedades eran la misma y provocadas por la interrupción de la misma proteína ⁽⁵¹⁾.

Las mutaciones detectadas en el gen UMOD alteran la estructura terciaria de la proteína uromodulina (producto de expresión génica). Posteriormente se identificaron 5 nuevas mutaciones en 3 familias españolas y 2 familias austriacas ⁽⁵²⁾. El hallazgo de una nueva mutación en una familia con enfermedad renal glomerulopática (GCKD) demuestra el alelismo existente entre MCKD-FJHN-GCKD ⁽⁵³⁾

Figura 3.1. Mapa físico y genético del locus 2. Acotamiento de la región ligada a la enfermedad, genes descritos en la región y secuenciados. El gen *UMOD* fue inicialmente descartado como responsable de la enfermedad (Pirelli et al) y confirmado posteriormente por Hart et al.



3.1.2.1. Biología de la Uromodulina

La uromodulina es una proteína de unos 90 kD, con 640 aminoácidos, de los cuales 24 son eliminados durante el procesamiento post-traduccional. En la proteína madura quedan así 616 aminoácidos entre los que se distribuyen los siguientes **dominios proteicos**:

- **cbEGF**: mediante el estudio de secuencia se determinaron 3 ó 4 dominios EGF^(54, 55), se caracterizan por su elevado contenido en cisteínas que suelen formar puentes disulfuro para obtener una estructura terciaria estable, donde se cree que los cbEGF II y III forman una estructura tipo bastón. Se encuentran distribuidos de la siguiente forma:

- del 32 al 63 (cbEGFI),
- del 69 al 106 (cbEGFII),
- del 112 al 148 (cbEGFIII) y
- del 297 al 335 (supuesto IV EGF).

- **ZP**: el dominio *Zona Pellucida* presente en varias proteínas es responsable de la polimerización de filamentos o matrices con una estructura supramolecular similar. Se ha sugerido que filamentos de diferentes proteínas que poseen dominios ZP pueden formar una arquitectura tridimensional común y que los segmentos de anclaje a la membrana de sus precursores son cruciales para la polimerización⁽⁵⁶⁾.



Figura 3.2. Distribución de los dominios proteicos en la uromodulina

- **GPI-anchor**: dominio de unión de una molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI), que permite su anclaje a la membrana⁽⁵⁷⁾. Este dominio de unión es una secuencia hidrofóbica de señal para una transpeptidasa del retículo endoplásmico (RE), al cortar el péptido con la transpeptidasa, se añade una molécula GPI a la nueva porción C-terminal de la uromodulina.

Motivos proteicos:

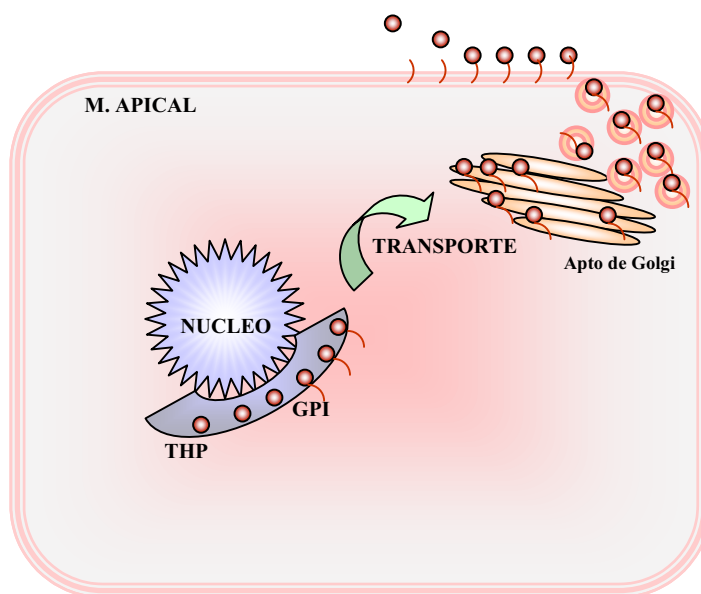
Se encuentran también diversos aminoácidos **asparragina** (N), en los que se produce la glicosilación (Figura 3.2).

En su estructura primaria aparecen también 48 residuos de **cisteína** implicados en la formación de puentes disulfuro intramoleculares, altamente conservados evolutivamente e implicados en la estructura terciaria de la proteína.

La uromodulina también expresa una secuencia **RGD** previamente descrita en otras proteínas de matriz extracelular, como la fibronectina, el fibrinógeno, el colágeno tipo 1 y la trombospodina que se unen al receptor de superficie celular de la súper-familia de las integrinas, implicado en la adhesión celular con la secuencia **Arg-Gly-Asp** en la posición 142-144 ^(58, 59).

En la orina, la uromodulina se asocia con otros monómeros para formar polímeros.

Figura 3.3. Diagrama de la biosíntesis y transporte intracelular de la uromodulina. La proteína es transportada del RE. hasta el Complejo de Golgi, para la glicosilación. A continuación es transportada por vesículas hasta la membrana apical donde, tras ser cortada con una peptidasa, es liberada al lumen tubular para ser excretada en la orina.



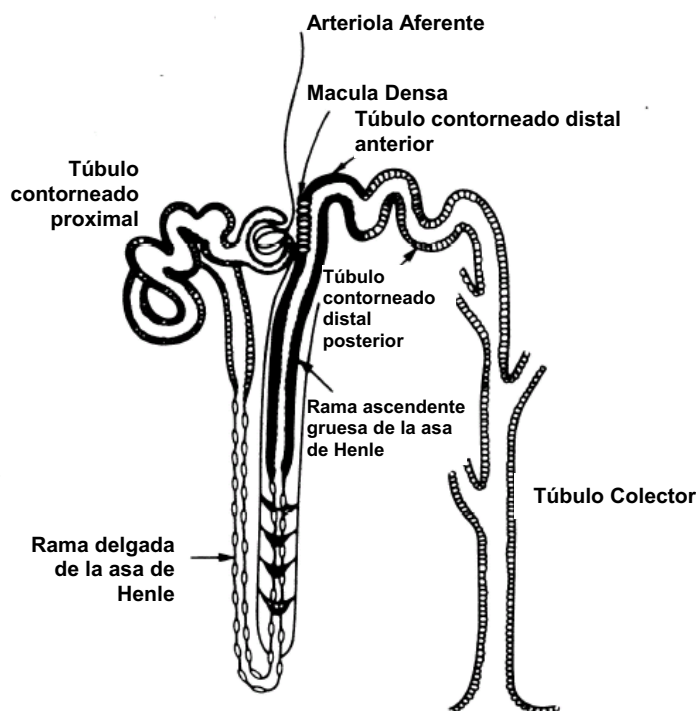
Aparentemente, al poseer un dominio GPI se encuentra anclada a la membrana apical en células epiteliales polarizadas de túbulo contorneado distal y rama gruesa de Henle.

La excreción urinaria es producida gracias al corte proteolítico que sufre entre los aminoácidos 524F - S525 ^(60, 61)

3.1.2.2. Función de la uromodulina

La relativa abundancia, localización específica en la nefrona y su conservación evolutiva sugiere que esta glicoproteína tiene importantes funciones fisiológicas en la porción ascendente gruesa del Asa de Henle (TAL).

Figura 3.4. Anatomía del riñón. La nefrona es la unidad funcional del riñón, compuesta por un Glomérulo donde se lleva a cabo la filtración, túbulo contorneado proximal, con conexión al distal por medio del asa de Henle. La síntesis de uromodulina está limitada a la rama gruesa ascendente de Henle y comienzo del túbulo contorneado distal (círculo)



Se ha demostrado que su tendencia a la formación de un gel o moco luminal puede ser responsable de la impermeabilidad al agua en esta porción de la nefrona, y se ha visto incrementada por diversos factores: presencia de iones de calcio y sodio ⁽⁶²⁾, albúmina ⁽⁶³⁾, radiocontraste ^(64, 65, 66) y proteína de Bence-Jones ⁽⁶³⁾.

La presencia del motivo **RGD** posibilita la capacidad de que actúe como una proteína de adhesión intercelular por medio de la unión a receptores integrina ⁽⁶⁷⁾.

Se propuso también un papel en la defensa urotelial contra infecciones en el tracto urinario ⁽⁶⁸⁾ al comprobar que la bacteria *Escherichia coli fimbriae* tipo I era atrapada por la uromodulina, y que la unión del “pili” era dependiente del contenido en manosa de la THP. Esos hallazgos fueron confirmados al comprobar que las bacterias cubiertas por uromodulina eran menos susceptibles de la fagocitosis por linfocitos polimorfonucleares que aquellas que carecían de esta cubierta ⁽⁶⁹⁾.

En otros estudios se ha resaltado su papel inmunomodulador, y sugieren que esta glicoproteína podría participar activamente en la regulación de los niveles circulantes y en la actividad biológica de varias citoquinas importantes como IL-1, TNF y IL-2 ^(70, 71).

3.1.3. Acotamiento del locus 3 de MCKD

Para buscar otras enfermedades asociadas a aquellas en las que se produce la alteración de la uromodulina *Hodanova y colaboradores* en el 2005 realizaron un estudio completo de todo el genoma en una familia belga, en la que se podía observar un fenotipo que incluía algunas características que se asociaban a la enfermedad renal quística medular en la que se había excluido el alineamiento a los 2 *loci* ya conocidos (1q21 y 16p11.2). Identificaron así un nuevo *locus* en el cromosoma 1.

Para un análisis más fino de la región usaron 38 marcadores microsatélites específicos de la región acotada. El análisis de los haplotipos y los eventos de recombinación detectados en los individuos afectados delimitaron una región candidata entre los marcadores ***DIS3470*** y ***DIS1644*** de unos 37 millones de pb. Los individuos afectados mostraban un fenotipo basado en la reducción de uromodulina en la orina e hiposecreción de uratos y calcio. Los ensayos de inmunohistoquímica de los riñones biopsiados de los pacientes mostraban una baja excreción de uromodulina provocado por una significativa disminución en la expresión de la proteína. Esta observación es claramente distinta a la observada en los otros *loci*, donde se puede comprobar un patrón de retención citoplasmático en estructuras perinucleares que causan la disminución de la secreción de uromodulina en la orina.

La familia manifestaba síntomas clínicos de anemia, hiperuricemia y una progresiva insuficiencia renal. Todos los afectados mostraban riñones de pequeño tamaño, ecogénicos en la ecografía y sin quistes renales aparentes. La edad media de IRCT de la familia fue de 61,3 años y no se observó ningún episodio de gota familiar.

Análisis de Inmunohistoquímica

Hodanova y colaboradores comprobaron el comportamiento de la uromodulina en individuos control, donde se encontró una gran reactividad en el túbulo contorneado

distal y conducto ascendente del asa de Henle (*TAL*). La localización de la proteína era principalmente en la superficie celular, mostrando un patrón de tinción en forma de anillo que rodeaba la luz del túbulo. Por el contrario, en los pacientes de esta familia belga se pudo comprobar una gran disminución de reactividad en las células, en los tres individuos estudiados, compatible con un patrón de disminución de la expresión del gen *UMOD*, comportamiento muy distinto al visto en pacientes con MCKD con ligamiento al *locus* 1 (cromosoma 1 región *1q21*) o con pacientes con mutaciones en el gen *UMOD*.

3.1.3.1. Análisis de Ligamiento

En el estudio participaron 9 familias, de las cuales, sólo una, presentó un *LOD Score* significativo de 0,6 para los marcadores D1S425, D1S2703 y D1S419 para esta región candidata. Tras el refinamiento de la región con más marcadores separados por una menor distancia se logró un valor de *LOD Score* de 2,07.

El análisis de haplotipos demostró en individuos afectados cosegregación con el fenotipo entre los marcadores D1S237 y D1S2670. En las 8 familias restantes no se pudo comprobar ligamiento positivo ni para esta región ni para los otros 2 loci caracterizados de MCKD (1q21 y 16p13), lo que evidencia la existencia de más loci de los 3 descritos implicados en la patogenia de la enfermedad.

3.1.3.2. Análisis mutacional de genes candidatos

La región delimitada entre los marcadores *D1S3470* y *D1S1644* posee unos 37 millones de pares de bases en las que existen al menos unos 300 genes (Anexo 1.2) que podrían ser candidatos potenciales de la enfermedad. Por supuesto, el análisis mediante secuenciación directa de la región es impensable, por lo que se necesita la caracterización de otras familias con MCKD que permitan acotar la región. *Hodanova y colaboradores* en el 2005 estudiaron 8 genes candidatos (*Tabla 3.1*) en los que encontraron cambios en la secuencia nucleotídica pero que no cosegregaban, excluyéndolos así como genes candidatos.

Tabla 3.1. Genes excluidos como candidatos en la región 1q41 (Hodanova et al 2005).

Posición		Símbolo	Descripción
Inicio	Fin		
196,75	196,77	3ATP6VIG3	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 13kda, V1 subunit G3
210,92	210,93	SNFT	Jun dimerization protein p21snft
211,09	211,13	FLVCR	Feline leukemia virus subgroup C cellular re
216,58	216,68	TGFB2	Transforming growth factor, β 2
218,29	218,32	BPNT1	3'(2'), 5'-bisphosphate nucleotidase 1
218,98	219,02	FLJ20605	MOCO sulphurase c-terminal domain containing 2
233,78	233,88	GNG4	Guanine nucleotide binding protein (G protein) gamma 4
234,37	234,43	TM7SF1	Seven Putative helical transmembrane domain upregulated in kidney development.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1. Aspectos clínicos e inclusión de las familias con MCKD

En el presente estudio se han incluido una serie de familias de distinta área geográfica diagnosticadas de nefropatía intersticial, con un tipo de herencia familiar autosómica dominante. Se han establecido previamente una serie de parámetros que deben estar presentes en el núcleo familiar para poder ser diagnosticadas ⁽³⁰⁾, estos parámetros son principalmente:

- Herencia Familiar de tipo Autosómico Dominante
- Hiperuricemia y/o artritis gotosa
- Histología con nefropatía intersticial
- Ausencia de proteinuria de rango glomerular

Se define **hiperuricemia** como elevadas concentraciones de ácido úrico en suero según los valores obtenidos de la relación sexo-edad por *Wilcox et al 1996* ⁽⁷²⁾

Niños, < 5 años: $\geq 3,6 \pm 0,9$ mg/dL; de 5 a 11 años: $\geq 4,1 \pm 1$ mg/dL.

Hombres, de 12 a 14 años: $\geq 4,4 \pm 1,1$ mg/dL; de 15 a 17 años: $\geq 5,6 \pm 1,1$ mg/dL; ≥ 18 años: $\geq 6,2 \pm 0,8$ mg/dL.

Mujeres, de 12 a 17 años: $\geq 4,5 \pm 0,9$ mg/dL; ≥ 18 años: $\geq 6,2 \pm 0,8$ mg/dL

Se consideran *valores anormales* de creatinina aquellos que en suero son superiores a $1,3$ mg/dL, para ambos sexos. Estos índices de creatinina fueron determinantes para la clasificación del nivel de la función renal en estado normal (menor de $1,3$ mg/dL) o con fallo renal ($1,3$ mg/dL o más). Las muestras de sangre fueron recogidas en tubos por el sistema en vacío, y las pruebas bioquímicas se realizaron en el Servicio de Análisis Clínicos de los hospitales participantes en el estudio. La presencia de quistes y cambios en el tamaño de los riñones de los pacientes fueron determinados mediante ecografía abdominal. En algunas familias, el diagnóstico

de la enfermedad fue contrastado mediante estudios de inmunohistoquímica realizados en el laboratorio de Inmunología del Servicio de Anatomía Patológica.

En base a estos criterios de inclusión han sido diagnosticadas treinta y seis familias del territorio nacional y una familia procedente de USA con historia de nefropatía familiar de tipo intersticial sin proteinuria de rango glomerular y con herencia autosómica de tipo dominante.

Cada familia posee al menos un paciente con insuficiencia renal. De las treinta y siete familias, aproximadamente un 80% presentaban al menos un paciente con niveles de creatinina en el suero por encima de los límites normales (*Tabla 3.3.*).

Se dispone de datos de ecografía abdominal de diecisiete familias, un 47% confirmaban presencia de quistes córtico-medulares en riñones de pequeño tamaño.

Los análisis de microscopía electrónica fueron realizados en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Santiago y revelaron un discreto aumento del grosor de las membranas basales glomerulares para las familias *F2*, *F3* y *F5*, además de un moderado grado de atrofia tubular en áreas contiguas de mayor afectación glomerular y también moderada fibrosis intersticial. En la familia *F8* la descripción microscópica reveló que de 10 estructuras glomerulares analizadas siete se encontraban globalmente esclerosadas. Los glomérulos no esclerosados preservaban la arquitectura normal, pero mostraron fibrosis periglomerular. A nivel túbulo-intersticial se observaron extensas áreas de esclerosis con túbulos atróficos con marcado engrosamiento de las membranas basales y áreas de infiltrado inflamatorio linfocitario. La microscopía de la *F10* mostró la presencia de glomérulos esclerosados, fibrosis periglomerular y fibrosis difusa intensa con atrofia tubular, mientras que en la microscopía de la *F14* se pudieron observar glomérulos con marcada fibrosis periglomerular. Además, en la *F14* fue detectada fibrosis irregular a nivel intersticial con túbulos atróficos sin infiltrado inflamatorio en el cilindro. En el material congelado, tras la biopsia de algunos pacientes de esta familia, se observó un moderado infiltrado inflamatorio difuso.

En las familias *F12*, *F15* y *F19*, no fueron observadas alteraciones glomerulares, sólo fibrosis intersticial clasificada entre leve y moderada.

Se efectuó una búsqueda mutacional en el gen *UMOD* en al menos un individuo afecto de cada familia, detectándose mutaciones en tan sólo cuatro de ellas (*F1-5*, *F2*, *F8* y *F30*), diagnosticadas como *MCKD* tipo 2 bajo criterios moleculares. Por lo que se han incluido las treinta y tres familias restantes para la búsqueda de genes candidatos de la *MCKD* asociada a otros loci.

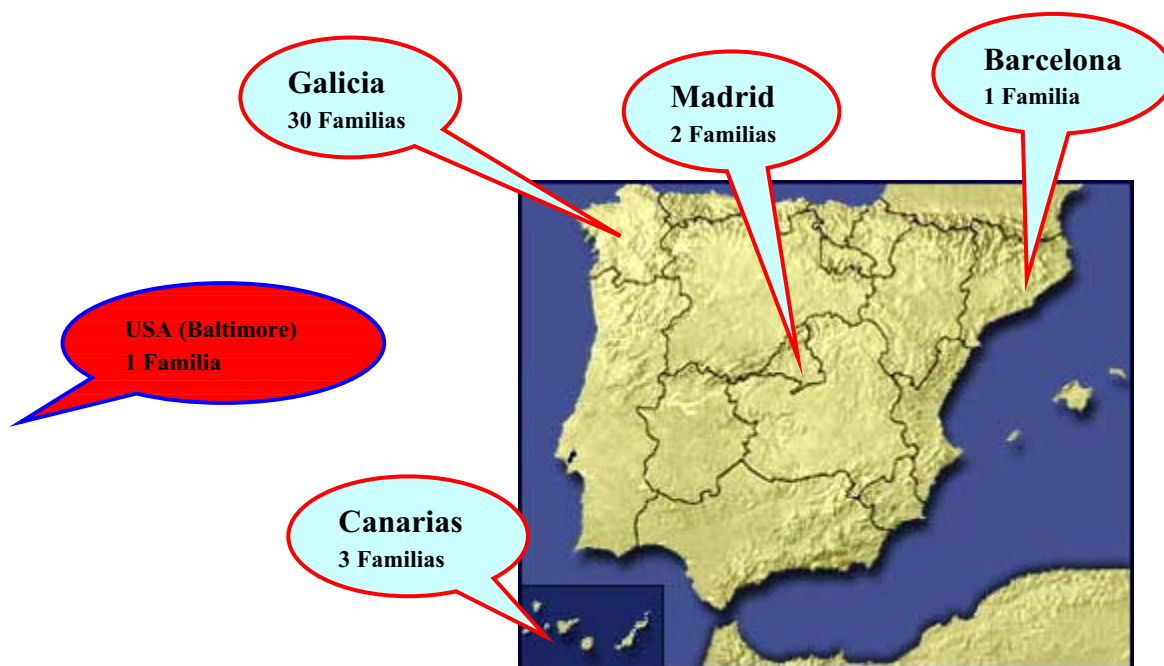


FIGURA 3.5. Distribución geográfica de las familias de MCKD.

Las familias *F11*, *F20*, *F24*, *F25*, *F29*, *F30* y *F45* fueron diagnosticadas clínicamente como MCKD en otros centros hospitalarios. Las familias *F11*, *F24* y *F25* fueron diagnosticadas como familias con nefropatía intersticial familiar en el Hospital Universitario de Canarias, Las Palmas, la familia *F20* en el hospital estadounidense Johns Hopkins Hospital, Baltimore, las familias *F29* y *F30* en el Hospital de Alcorcón, Madrid como nefropatías familiares asociadas a hiperuricemia y gota, y la familia *F45* en Barcelona.

Tabla 3.2. Relación de familias diagnosticadas con MCKD. Descripción familiar, datos clínicos y criterios de inclusión + presencia, – ausencia, ND no existen datos, A: individuos afectados y S: individuos sanos

<i>Familia</i>	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>S</i>	<i>HiperU</i>	<i>Gota</i>	<i>Edad de IRCT (años)</i>	<i>Eco</i>	<i>Nº Quistes Medulares</i>	<i>NTI</i>
F1	6	4	2	+	+	73	2	+	–
F2	21	13	8	+	+	55, 22, 65, 61, 50, 58, 66, 60, 56, 45	11	ND	+
F3	12	4	8	–	–	42, 27, 41	2	–	+
F5	4	2	2	–	+	42	SD	ND	+
F6	3	2	1	–	+	35, 43	1	+	ND
F7	5	1	4	+	+	62	1	–	ND
F8	18	3	15	+	+	70, 67, 64	1	–	+
F9	1	1	0	+	–	–	1	–	ND
F10	2	2	0	–	–	57	2	+	+
F11	16	3	13	ND	ND	ND	–	ND	ND
F12	1	1	0	+	–	50	1	+	+
F13	7	2	5	+	+	–	2	+	–
F14	1	1	0	+	+	–	1	–	+
F15	1	1	0	+	+	–	1	–	+
F17	2	1	1	+	–	–	1	+	ND
F18	1	1	0	–	+	–	1	+	–
F19	1	1	0	–	–	–	–	ND	+
F20	7	5	2	ND	ND	32, 30	+	+	ND
F21	1	1	0	+	+	–	–	ND	+
F22	1	1	0	–	+	–	–	ND	ND
F23	1	1	0	ND	+	–	–	ND	ND
F24	1	1	0	+	ND	50	–	ND	+
F25	1	1	0	+	ND	50	1	+	+
F26	1	1	0	+	–	–	–	ND	+
F27	2	1	1	+	+	–	1	–	ND
F28	1	1	0	+	–	–	ND	ND	ND
F29	1	1	0	–	+	65	–	ND	+
F30	4	4	0	+	+	62, 55	1	–	+
F32	1	1	0	+	–	–	–	ND	ND
F33	9	3	6	+	ND	73	–	ND	ND
F34	4	1	3	+	+	68	–	ND	ND
F35	1	1	0	–	–	–	1	+	ND
F39	1	0	0	ND	ND	77, 40	ND	ND	ND
F44	1	0	0	+	+	–	1	+	+
F45	1	0	0	–	–	–	1	+	ND
F46	1	0	0	+	+	–	–	ND	ND
F47	2	0	0	+	+	–	–	ND	ND
F48	2	0	0	+	+	–	–	ND	+

III. Caracterización clínica de familias con MCKD y ligamiento genético al cromosoma 1

Tabla 3.3. Datos fenotípicos de los individuos afectados por MCKD. N° Ind.: número de individuos en la familia; O: Origen (G: Galicia, M: Madrid, B: Barcelona, USA: Baltimore, C: Canarias); HiperU: hiperuricemia; Cr: creatinina sérica mg/dL *IRCT, insuficiencia renal crónica terminal; E.D.Q: edad de detección de los quistes; ¹ND, no disponible; ²HTA, hipertensión arterial; (-) ausencia. §Ambas concentraciones de creatinina y ácido úrico en el suero fueron determinadas a partir de una misma muestra de sangre.

Paciente	Nº Ind.	O	Sexo	Edad actual	HiperU (Edad)	Gota (Edad)	§Cr.	§Ác. úrico (mg/dl)	IRCT* (Edad)	E.D.Q	Otras complicaciones
Familia 1-5											
IV.4	6	G	M	Exitus	69	–	–	8,5	73	73	HTA ²
V.1			V	54	45	45	ND ¹	ND ¹	–		HTA ²
V.2			V	53	ND ¹	+	1,8	ND ¹	–		HTA ²
V.4			M	52	51	–	1,8	6,7	–		
V.5			M	55	–	–	ND ¹	ND ¹	–		
V.6			M	51	–	–	0,8	3,2	–		
V.7			V	59	–	–	–	ND ¹	42		
V.8			M	53	23	23	2,5	8	–		
Familia 2											
III.4	21	G	V	66	ND ¹	ND ¹	–	ND ¹	60	ND ¹	
IV.2			M	26	22	–	1	7,2	–	–	
IV.4			V	53	46	–	1	6,9	–	–	
IV.5			M	Exitus	8	–	–	8,8	22	22	
IV.6			M	70	ND ¹	ND ¹	–	ND ¹	50	ND ¹	
IV.7			M	40	30	–	1,6	7,6	–	–	
IV.8			V	39	23	23	1,6	8,5	–	–	
IV.9			M	15	12	–	0,7	7,4	–	–	
V.1			V	29	29	29	1,1	6,2	–	–	
V.3			V	32	–	–	1,2	6,5	–	–	
V.4			V	55	50	–	1,4	8,3	–	–	HTA ²
V.5			V	40	–	–	0,6	5,4	–	–	
V.6			V	43	16	–	1,7	6,5	–	36	
VI.1			V	57	14	14	–	6,1	55	35	HTA ²
Familia 3											
II.1	12	G	V	57	40	–	–	11,4	41		HTA ²
II.3			V	52	–	–	–	ND ¹	27		
II.5			M	48	ND ¹	–	6,8	ND ¹	42	–	HTA ²
III.1			V	30	–	–	1,4	5,9	–		
III.2			M	31	–	–	1,2	6	–		
III.4			M	26	–	–	0,7	ND ¹	–		
III.5			V	20	–	–	0,8	ND ¹	–		
Familia 6											
II.1	3	G	M	68	56	46	10,9	7,9	43	ND ¹	HTA ²
III.2			V	49	39	39	2,1	14,1	35	41	HTA ²
Familia 7											
II.1	5	G	V	67	40		6,2	7,9	63		HTA ² , perdedora de sal
Familia 8											
II.1	1	G	V	–	40	40	9,1	7,9	67	62	
II.10			V	65	50	50	4,3	9,8	64	51	HTA ²

Paciente	Nº Ind.	O	Sexo	Edad actual	HiperU (Edad)	Gota (Edad)	§Cr.	§Ác. úrico (mg/dl)	IRCT* (Edad)	E.D.Q	Otras complicaciones
III.1			M	51	–	–	1,4	5,5	–	ND ¹	HTA ²
III.3			M	51	51	–	0,8	5,3	–	ND ¹	HTA ²
III.4			V	53	52	34	1	11,1	–	ND ¹	
III.5			V	32	–	–	0,9	6,8	–	ND	HTA ²
III.6			V	32	27	–	0,9	7	–	ND ¹	
IV.1			V	30	27	–	1,5	7,3	–	ND ¹	
IV.3			M	28	–	–	0,9	4,1	–	ND ¹	
Familia 9											
II.2	1	G	M	71		-	2,4		-	¿?	
Familia 10											
III.3	2	G	M	63		–	3,1	8,5	57	–	HTA ²
IV.3			V	59	–	–	1,6	8,1	–	55	HTA ²
Familia 11											
I.1			V	60	ND ¹	–	2	ND ¹	50	30	HTA ²
Familia 12											
I.1	1	C	V	60	ND ¹	–	ND ¹	ND ¹	50	ND ¹	HTA ²
Familia 13											
II.3	7	G	V	50	40	40	1,7	8,7	–	45	
III.2			V	–	–	–	ND ¹	ND ¹	–	12	
Familia 14											
I.1	1	G	V	52	40		7,8	3,4	44	–	HTA ² , Proteinuria
Familia 15											
II.2	6	G	V	46	18	18	2,1	5,9	–	–	
Familia 17											
II.2	2	G	M	61	–	–	1,1	6,0	–	–	
III.2			M	41	–	–	ND ¹	ND ¹	–	33	Hepatopatía, Diabetes
Familia 18											
I.1	1	G	M	54	ND ¹	ND ¹	2,6	ND ¹	–	46	
Familia 19											
II.2	1	G	V	67	–	–	6,5	4,8	61	–	
Familia 20											
II.1	7	USA	M	ND	–	–	ND	ND	30	ND	Riñones pequeños
II.4			M	ND	–	–	ND	ND	32	ND	Riñones pequeños
III.1			M	ND	–	–	ND	ND	–	ND	
III.3			V	ND	–	–	ND	ND	–	ND	
III.5			V	ND	–	–	ND	ND	–	ND	
Familia 21											
II.1	1	G	M	Exitus	ND ¹	+	ND ¹	ND ¹	67	ND ¹	
II.3			M	77	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹	51	ND ¹	
III.1			V	57	51	51	1,8	8,4	–	ND ¹	
Familia 22											
I.1	1	G	V	59	–	–	1,7	ND	–	–	Proteinuria
Familia 23											
I.1	1	G	M	68	ND	56	4,4	8,5	–	–	
Familia 24											

III. Caracterización clínica de familias con MCKD y ligamiento genético al cromosoma 1

Paciente	Nº Ind.	O	Sexo	Edad actual	HiperU (Edad)	Gota (Edad)	§Cr.	§Ác. úrico (mg/dl)	IRCT* (Edad)	E.D.Q	Otras complicaciones
I.1	1	C	M	ND¹	ND¹	ND¹	ND¹	ND¹	50	–	
Familia 25											
	1	C	V	ND	15	–	ND	ND	50	–	
Familia 26											
I.1	1	G	M	53	37	–	2,4	11,4	–	49	Tamaño pequeño
Familia 27											
I.1	2	G	M	71	ND¹	35	3,8	8,2	–	–	
Familia 28											
I.1	1	G			2140182						
Familia 29											
III.1	10	M	M	47	ND¹	ND¹	ND¹	ND¹	–	ND¹	
III.2			V	46	28	20	2,4	5,2	–	ND¹	
III.3			V	41	<35	ND¹	ND¹	ND¹	–	ND¹	
Familia 30											
II.1	4	M	M	65	50	ND¹	–	7,6	62		HTA²
II.2			V	64	46	46	–	9,8	55		
III.1			M	33	15	–	1,7	7,7	–		
III.2			M	31	12	–	1,4	7,4	–		
Familia 32											
I.1	1	G	M	27	23	–	1,4	8,7	–	ND¹	
Familia 33											
V.1	9	G									
V.11			V	15	1	–					
Familia 34											
I.1	1	G	V	70	ND¹	35	–	7,2	68	64	HTA²
Familia 35											
I.1	1	G	V	77		74	1,8	ND¹		68	HTA²
Familia 39											
I.1		G									
Familia 44											
I.1	1	G	V	58	16	16	1,6	5,2	–	50	RD pequeño
Familia 45											
I.1	1	G	V	40	–	–	ND	ND	–	35	–
Familia 46											
I.1	1	G	V	60	58	58	1,7	9,5	–	–	–
Familia 47											
I.1	1	B	V	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Familia 48											
II.2	2	G	M	37	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
II.7			M	45	44	44	3,54	ND	–	–	–

3.2.2. Aspectos clínicos e inclusión de los individuos con Nefropatía Intersticial Esporádica

La *NPH* autosómica recesiva puede presentarse con afectación exclusiva renal, asociarse a anomalías extrarrenales, principalmente retinianas, o bien constituir parte de síndromes más complejos ⁽⁷³⁻⁸⁷⁾. Supone las dos terceras partes del "complejo *NPH-MCKD*", constituye la causa genética más común de IRC en las dos primeras décadas de la vida y es causa del 10-20% de las IRCT en la infancia ^(88, 89). La *MCKD*, más rara, supone una tercera parte los casos del "complejo *NPH-MCKD*", no asociada a patologías extrarrenales e indistinguible desde el punto de vista patológico de la *NPH*.

Se incluyen en un grupo intermedio a ambas patologías un tipo de nefropatía intersticial de idéntica patología a la *MCKD-NPH*, esporádica o aparentemente autosómica recesiva, asociada a manifestaciones extrarrenales como retinitis pigmentaria, hepatopatía, retraso mental e hipoacusia como la *NPH* pero con evolución a IRCT a la edad adulta, al igual que la *MCKD*.

Manifestaciones Renales:

Macroscópicamente los riñones son de tamaño normal y sin quistes al inicio de la enfermedad, pequeños en ocasiones, atróficos, con corteza fina y con quistes de 10-15 mm en la región yuxtamedular en estadios terminales.

A microscopia óptica en etapas iniciales se ven infiltrados linfoplasmocitarios con vasos, túbulos y glomérulos normales; progresivamente aparece fibrosis intersticial extensa, túbulos distales y colectores con dilataciones saculares y engrosamiento de sus membranas basales alternando con túbulos atróficos.

Al microscopio electrónico la membrana basal glomerular es normal.

Manifestaciones Extrarrenales:

Anomalías Oftalmológicas: las más comunes son la degeneración de la capa pigmentaria de la retina y la retinitis pigmentaria asociada con ceguera.

Alteraciones del sistema nervioso central: las más comunes son la ataxia cerebelosa y el retraso mental, casi siempre asociadas a las anteriores.

Afectación hepática: consistente en fibrosis hepática con escasa hiperplasia de los conductos biliares (a diferencia de la ARPKD). Asociada a retinitis pigmentaria, retraso mental o displasia epifisaria.

Hipoacusia Neurosensorial Bilateral.

Se han incluido en el estudio un total de 9 individuos diagnosticados de nefropatía intersticial, con manifestaciones extrarrenales asociadas (*Tabla 3.4.*). El individuo *N.I.1* se trata de un varón de 63 años de edad con nefropatía intersticial asociada a retinosis pigmentaria e hipoacusia, debuta a la edad de 25 años detectándose niveles elevados de ácido úrico, con HTA y en la ecografía abdominal presenta riñones ligeramente pequeños sin presencia de quistes.

El individuo *N.I.2* es una mujer, con nefropatía intersticial de lenta evolución a insuficiencia renal, hipoacusia y retinosis pigmentaria. El individuo *N.I.3* se trata de una mujer también, con nefropatía intersticial e IRCT a los 57 años y retinosis pigmentaria.

El individuo *N.I.5* presenta además de nefropatía intersticial, hipoacusia neurosensorial bilateral e IRCT a los 35 años.

Tabla 3.4. Individuos con nefropatía intersticial no compatible con nefronoptosis ni MCKD por presentar fenotipo típico de NPH pero con IRCT de MCKD. HiperU: presencia de niveles elevados de ácido úrico en suero (mg/dL), Cr: creatinina sérica (mg/dL), edad de debut, IRCT: Insuficiencia renal crónica terminal. Dentro de las manifestaciones extrarrenales características de la nefronoptosis se han incluido: R.P: Retinosis Pigmentaria; H.N.B: Hipoacusia Neurosensorial Bilateral; H: hepatopatía y R.M: retraso mental.

Paciente	Sexo	Edad actual	HiperU	Gota	Cr.	Ac. Úrico	Debut	IRCT	Manifestaciones Extrarrenales			
									R.P	H.N.B	H	R.M
<i>N.I.1</i>	V	63	SI	NO	3,3	N.D	25	-	+	+	-	-
<i>N.I.2</i>	M	55	NO	NO	ND	ND	42	-	+	+	-	-
<i>N.I.3</i>	M	62	NO	NO	ND	ND	ND	57	+	-	-	-
<i>N.I.5</i>	M	39	NO	NO	5,4	ND	33	35	-	+	-	-
<i>N.I.6</i>	M	61	NO	NO	ND	ND	ND	55	+	+	-	+
<i>N.I.7</i>	M	41	SI	NO	1,9	9,9	32	-	-	-	+	+
<i>N.I.8</i>	V	72	NO	NO	0,87	4,3	57	-	+	-	+	-
<i>N.I.9</i>	V	54	NO	NO	ND	ND	ND	-	-	-	-	+
<i>N.I.12</i>	M	Exitus	ND	NO	ND	ND	ND	40	+	-	-	-
	M	46	SI	SI	ND	ND	ND	30	+	-	-	-

El individuo *N.I.6* presenta retraso mental, con hipoacusia familiar, retinosis pigmentaria e IRCT a los 55 años de edad. El individuo *N.I.7* se trata de una mujer, con debut a los 32 años con detección de HTA durante el embarazo. Muestra riñones de pequeño tamaño, con parénquima ecogénico y múltiples dilataciones quísticas inferiores a 2 centímetros, con niveles altos de ácido úrico, retraso mental asociado y hepatomegalia.

El individuo *N.I.8* tiene actualmente 72 años y presenta insuficiencia renal, con fibrosis hepática, HTA, esplenomegalia y ácido úrico 4,3 mg/dL.

El varón *N.I.9* presenta además de nefropatía intersticial agénesis renal (sólo uno), con retraso mental e HTA. Finalmente se presenta una familia en la que se han detectado dos hermanas con nefropatía intersticial, una de ellas desarrolla IRCT a la edad de 30 años, fallece hace aproximadamente 25 años, presenta también nefropatía perdedora de sal, poliuria, riñones de pequeño tamaño y quistes. Su hermana tiene actualmente 46 años, es la incluida en el estudio de genes candidatos, desarrolla IRCT a los 40 años de edad, episodios de artritis gotosa y retinosis pigmentaria.

3.2.3. Obtención del ADN purificado

Método salino (*Kit Puregene*)

Se procede a la extracción de ADN a partir de sangre periférica recogida en tubos en vacío con EDTA disódico. La extracción se lleva a cabo mediante el protocolo comercial de extracción de ADN de *Puregene* (Gentra System, Inc).

En 3 mL de sangre se añaden en un primer paso 9 mL de solución RBC (*Red Blood Cell Lysis Solution*), que rompe plaquetas y glóbulos rojos. Se agita por inversión sangre y RBC hasta obtener una mezcla homogénea y se incuba diez minutos a temperatura ambiente repitiendo el proceso de inversión al menos dos veces más.

Se centrifuga a 3500 rpm durante diez minutos, se descarta el sobrenadante, obteniéndose aproximadamente unos 100 µL de sedimento y líquido residual que deben ser agitados enérgicamente para resuspender los leucocitos que han precipitado.

El siguiente paso consiste en la adición de 3 mL de solución “*Cell Lysis Solution*”, se mezcla nuevamente la muestra hasta que sea homogénea y pudiéndose almacenar a 4°C hasta 18 meses. Tras obtener una muestra homogénea se añade 1 mL de solución “*Protein Precipitation*”, se agita nuevamente durante 20 segundos y se centrifuga a 3500 rpm durante 10 minutos, tras el cual se observa un sedimento proteico que descartamos para rescatar el sobrenadante en el que se encuentra el ADN.

A continuación se añaden 3 mL de isopropanol 100%. Esta mezcla debe ser sometida a un proceso de inversión hasta que el ovillo de hebras de ADN se vuelva visible. Una vez conseguido visualizar el ovillo de ADN se procede a una centrifugación a 3500 rpm durante 3 minutos, para que las hebras de ADN permanezcan adheridas a la pared del tubo. Se retira el sobrenadante y de forma invertida sobre papel secante se eliminan los residuos de isopropanol que pudiesen permanecer en los bordes.

Finalmente se efectúa un lavado mediante el uso de etanol 70% a 4°C, se centrifuga cinco minutos a 3500 rpm, se descarta el sobrenadante y nuevamente de forma invertida se deja secar hasta eliminar por completo los restos de etanol.

Una vez se tiene el ovillo seco se añaden 250 µL de agua destilada para la rehidratación del ADN.

3.2.4. Análisis de los marcadores microsatélites

Para el análisis de ligamiento al locus 1 se han incluido tan sólo aquellas familias de las que se posee información de más de dos individuos en dos generaciones distintas y con ADN de al menos 1 afecto.

Otro criterio de inclusión para el estudio de ligamiento de estas regiones ha sido la exclusión de ligamiento al locus 2 o la ausencia de mutaciones en el gen UMOD.

Se han utilizado cinco marcadores microsatélite distintos siendo el más centromérico el D1S498, D1S2715, D1S1595, D1S2125 y D1S1653 el telomérico.

De las 37 familias diagnosticadas como MCKD se han incluido para el estudio de ligamiento diez familias distintas: *F3, F6, F7, F11, F13, F15, F20, F29, F33, F34*, con un total de 79 individuos, veinticinco afectados, veintitrés sanos y treinta y un individuos con edades comprendidas entre los seis y cuarenta años que no han manifestado síntomas clínicos de la enfermedad o todavía no han sido analizados pero de los que se dispone de ADN.

Para el análisis de ligamiento al *locus* 3 se han incluido ocho familias distintas: *F3, F6, F7, F11, F15, F29, F33, F34*, con un total de 65 individuos analizados con dieciocho afectados, diecisiete sanos y treinta individuos que no han manifestado la enfermedad o no han sido analizados ni bioquímicamente ni por ecografía.

Se han utilizado nueve marcadores microsatélite distintos siendo el más centromérico el D1S3470, D1S1660, D1S1723, D1S245, D1S425, D1S217, D1S419, D1S2141 y D1S1644 el telomérico.

3.2.4.1. Marcadores Microsatélite para el locus 1 (Cromosoma 1q21)

3.2.4.1.1. Multiplex 1

Los marcadores microsatélite **DIS1595**, **DIS1653** y **DIS2715** fueron amplificados en las siguientes condiciones: 62,5 ng/μl de ADN genómico, 200 μM de dNTPs, 10 pmol de DIS1595, 10 pmol de DIS1653 y 10 pmol de DIS2715 (cada uno de ellos marcado con un fluorocromo distinto, *Tabla 3.5*), el cebador con sentido DIS1595 marcado con el fluorocromo 6-FAM[™] (*Applied Biosystems, Warrington, UK*), el DIS1653 marcado con el fluorocromo 6-FAM[™] (*Applied Biosystems, Warrington, UK*) y el DIS2715 marcado con el fluorocromo NED[™] (*Applied Biosystems, Warrington, UK*), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl a pH 9.3, 1.5 mM MgCl₂ y 1U de Taq polimerasa (*PCR Supermix, Gibco*), para un volumen total de 25 μl. La amplificación de la *multiplex 1* fue realizada en las condiciones siguientes: 1 ciclo a 95°C durante 12 minutos, 10 ciclos a 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos y 72°C durante 15 segundos; 20 ciclos a 89°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos y 72°C durante 15 segundos. Se realizó un paso de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Tabla 3.5. Relación de los marcadores microsatélite utilizados para el análisis de ligamiento al locus 1. H= Heterocigosidad; T^a A= Temperatura de anillamiento; T.E= Tiempo de Extensión necesario para la amplificación del STR en segundos.

STR	Cebadores 5' → 3'		Rango alelos (bp)	Posición (cM)	Tipo de Rep	Rep.	H	T ^a A. (°C)	T. E (seg.)
DIS498	S	TTGCTGAAGGGACATAGTG	183	149,5	2x	CA	0,8200	60	60
	A	TGCTGGGTATATCAATATC	205						
DIS2715	S	CACAGGATTCTGCGTCTAACT	150	151,8	2x	CA	0,7241	55	15
	A	TGCTCCAAGAACTGAAGTGA	168						
DIS1595	S	ATGGTATGAACCTGGAGGTG	265	153,9	4x	GATA	ND	55	15
	A	GGCAGATAAAAGGACTGCAA	293						
DIS2125	S	AACCAGCACATTGTCACATG	95	155,5	3x	TAA	ND	56	60
	A	TTTTTTGTGGAATGCAGCTT	116						
DIS1653	S	GGAAAGCCTGTAGGAAGAGG	100	156,1	4x	TCTA	ND	55	15
	A	CCTGGATGACAGAGTGCTCT	112						

3.2.4.1.2. PCR 1

El marcador microsatélite **DIS498** fue amplificado en las siguientes condiciones: 32,5 ng/μl de ADN genómico, 200 μM de dNTPs, 10 pmol de cebador D1S498, el cebador con sentido D1S498 marcado con el fluorocromo *VIC*[™] (*Applied Biosystems, Warrington, UK*), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl a pH 9.3, 1.5 mM MgCl₂ y 1U de *Taq* polimerasa (*PCR Supermix, Gibco*), para un volumen total de 12,5 μl. La amplificación de la *PCR 1* fue realizada en las condiciones siguientes: 1 ciclo a 95°C durante 5 minutos, 25 ciclos a 94°C durante un minuto, 60°C durante un minuto y 72°C durante un minuto. Se realizó un paso de extensión final a 72°C durante 7 minutos.

3.2.4.1.3. PCR 2

El marcador microsatélite **DIS2125** fue amplificado en las siguientes condiciones: 32,5 ng/μl de ADN genómico, 200 μM de dNTPs, 10 pmol de cebador, el cebador con sentido D1S2125 marcado con el fluorocromo *PET*[™] (*Applied Biosystems, Warrington, UK*), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl a pH 9.3, 1.5 mM MgCl₂ y 1U de *Taq* polimerasa (*PCR Supermix, Gibco*), para un volumen total de 12,5 μl. La amplificación de la *PCR 2* fue realizada en las condiciones siguientes: 1 ciclo a 95°C durante 5 minutos, 28 ciclos a 94°C durante un minuto, 56°C durante 1 minuto y 72°C durante un minuto. Se realizó un paso de extensión final a 72°C durante 6 minutos.

3.2.4.2. Marcadores Microsatélite para el locus 3 (Cromosoma 1q41)

En el estudio se usaron nueve marcadores microsatélites de la región *1q41* delimitada por *Hodanova y colaboradores*, 2005 para el genotipaje de las familias (*Tabla 3.6*). Para los nueve marcadores (**DIS3470, DIS1660, DIS1723, DIS2668, DIS245, DIS425, DIS217, DIS419, DIS2141, DIS1644**) las reacciones fueron hechas en las siguientes condiciones: 40-50 ng/μl de ADN genómico, 200 μM de dNTPs, 10-12,5 pmol de cada cebador (cada uno de ellos marcado con un fluorocromo específico), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl a pH 9.3, 1.5 mM MgCl₂ y 1U de *Taq* polimerasa para un volumen total de 25 ó 12,5 μl (*PCR Supermix, Gibco*).

Las condiciones de amplificación y desnaturalización de los cebadores fueron diferentes dependiendo de las características térmicas de cada uno de ellos.

3.2.4.2.1. Duplex A

Las reacciones (**DIS1660**, **DIS2141**) fueron realizadas en las siguientes condiciones: 50 ng/μl de ADN genómico, 200 μM de dNTPs, 12,5 pmol de cada cebador (cada uno de ellos marcado con un fluorocromo distinto, *Tabla 3.6*), el cebador con sentido **DIS1660** marcado con el fluorocromo 6-FAM[™] (*Applied Biosystems, Warrington, UK*), y el **DIS2141** marcado con el fluorocromo NED[™] (*Applied Biosystems, Warrington, UK*), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl a pH 9.3, 1.5 mM MgCl₂ y 1U de *Taq* polimerasa para un volumen total de 25 μl (*PCR Supermix, Gibco*). Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo a 95°C durante cinco minutos y 27 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 75 segundos y 72°C durante 15 segundos. Se realizó un paso de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

3.2.4.2.2. Duplex B

Los cebadores (**DIS217**, **DIS419**) fueron amplificados en las siguientes condiciones: 42,5 ng/μl de ADN genómico, 200 μM de dNTPs, 10 pmol de **DIS217**, 10 pmol de **DIS419**, (cada uno de ellos marcado con un fluorocromo distinto, *Tabla 3.6*), el cebador con sentido **DIS217** marcado con el fluorocromo 6-FAM[™] (*Applied Biosystems, Warrington, UK*), y el **DIS419** marcado con el fluorocromo NED[™] (*Applied Biosystems, Warrington, UK*), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl a pH 9.3, 1.5 mM MgCl₂ y 1U de *Taq* polimerasa para un volumen total de 12,5 μl (*PCR Supermix, Gibco*). La amplificación del *duplex B* fue realizada en las condiciones siguientes: un ciclo a 95°C durante 12 minutos, 10 ciclos a 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos y 72°C durante 15 segundos; 20 ciclos a 89°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos y 72°C durante 15 segundos. Se realizó un paso de extensión a 72°C durante 10 minutos.

Tabla 3.6. *Relación de los marcadores microsatélite utilizados para el análisis de ligamiento al locus 3. H= Heterocigosidad; T^a A= Temperatura de anillamiento; T. Extensión Tiempo de Extensión necesario para la amplificación del STR.*

STR	Cebadores 5' → 3'		Rango Alelos (pb)	Posición	Tipo de Rep.	Rep.	H	T ^a A. (°C)	T. E (seg.)
DIS3470	S	^{6-FAM} -GGGTGCAAAAGTATTTGTGG	273	187'2cM	4x	CTAT	ND	55	75
	A	GAGGTGACTTTAATCCAACCTGG	313						
DIS1660	S	^{6-FAM} -TGCTATCCTCTCACCAGTGA	226	196'8cM	4x	TCTA	ND	55	75
	A	GTCTGAAGTTCATGGGAACG	250						
DIS1723	S	^{PET} -AACTGTGTCCAGCAGCAACT	167	199'6cM	2x	CA	0.8248	55	75
	A	TATGTGCCTGTTGTGTGCAT	181						
DIS245	S	^{PET} -GACCCCTTTACCTGAGGC	235	207'6cM	2x	CA	0.8265	55	75
	A	CGCTTTGATAGATTTAGCACTG	253						
DIS425	S	^{VIC} -CTAAAACAAAACACTCAGAACCACA	92	210'1cM	2x	CA	0.8140	55	30
	A	ACCTAGCACAAGGCTTCACA	108						
DIS217	S	^{6-FAM} -TTATAACCAACCCTGTCACAG	130	211'1cM	2x	CA	0.6629	55	15
	A	GCACATTTCCGGTAAAAGAA	142						
DIS419	S	^{NED} -AGCTGGTCTCTGTCTGGAT	162	212'6cM	2x	CA	0.8500	55	15
	A	CGCATGTAAGTTGGGG	194						
DIS2141	S	^{NED} -AGACTTACAGCACTGGCTGC	236	213'2cM	4x	TATC	ND	55	75
	A	TGCTCCTAGGAAAGGAAACA	263						
DIS1644	S	^{VIC} -GGATTGAGCCACAATACCAG	253	224'5cM	4x	TATG	ND	55	75
	A	ATACCTATGGAGGTGCACCA	281						

3.2.4.2.3. PCR C

El cebador **DIS425** fue amplificado en las siguientes condiciones: 42,5 ng/μl de ADN genómico, 200 μM de dNTPs, 10 pmol de DIS425, con el cebador con sentido marcado con el fluorocromo *VIC*[™], (Tabla 3.6), (Applied Biosystems, Warrington, UK), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl a pH 9.3, 1.5 mM MgCl₂ y 1U de *Taq* polimerasa para un volumen total de 12,5 μl (*PCR Supermix*, Gibco). La amplificación de la **PCR C** fue realizada en las condiciones siguientes: un ciclo a 95°C durante 5 minutos, 27 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 15 segundos. Se realizó un paso de extensión final a 72°C durante 6 minutos.

3.2.4.2.4. *Multiplex D*

Los cebadores **D1S1723**, **D1S3470** y **D1S1644** fueron amplificados en las siguientes condiciones: 50 ng/μl de ADN genómico, 200 μM de dNTPs, 12,5 pmol de cada cebador D1S1723, D1S3470, D1S1644, con el cebador con sentido marcado con los fluorocromos *VIC*TM para el marcador D1S1723, (*Applied Biosystems, Warrington, UK*), *6-FAM*TM para el marcador D1S3470, (*Applied Biosystems, Warrington, UK*) y *VIC*TM para el marcador D1S1644, (*Tabla 3.6*) (*Applied Biosystems, Warrington, UK*), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl a pH 9.3, 1.5 mM MgCl₂ y 1U de *Taq* polimerasa para un volumen total de 25 μl (*PCR Supermix, Gibco*). La amplificación de la **multiplex D** fue realizada en las condiciones siguientes: un ciclo a 95°C durante 5 minutos, 27 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 75 segundos y 72°C durante 15 segundos. Se realizó un paso de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

3.2.4.2.5. *PCR E*

El cebador **DIS245** fue amplificado en las siguientes condiciones: 42,5 ng/μl de ADN genómico, 200 μM de dNTPs, 10 pmol de D1S245, con el cebador con sentido marcado con el fluorocromo *PET*TM, (*Tabla 3.6*) (*Applied Biosystems, Warrington, UK*), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl a pH 9.3, 1.5 mM MgCl₂ y 1U de *Taq* polimerasa para un volumen total de 12,5 μl (*PCR Supermix, Gibco*). La amplificación de la **PCR E** fue realizada en las condiciones siguientes: un ciclo a 95°C durante 5 minutos, 27 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 75 segundos y 72°C durante 15 segundos. Se realizó un paso de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador “*Primus 96 Plus*” (*MWG AG Biotech*).

3.2.4.3. Desnaturalización

Una vez finalizada la amplificación 0,5 µl del producto de *PCR* fue cargado en placas *Genetic Analyzer Plate Septa 96-Well* junto con 9,3 µl de *Hi-Di™ Formamide* (*Applied Biosystems, Warrington, UK*) y 0,2 µl de marcador de peso molecular para fragmentos de hasta 500 pb marcado con LIZ, *GeneScan™ 500LIZ™* (*Applied Biosystems, Warrington, UK*) con un volumen final de 10 µl para cada reacción.

La mezcla realizada para cada reacción fue sometida a un ciclo de desnaturalización para la evitar la complementación de los fragmentos de 95°C durante cinco minutos seguida de un rápido enfriamiento en hielo durante cinco minutos para evitar la complementación de los fragmentos.

Todos los fragmentos de los marcadores microsatélites fueron procesados en ABI3130xl (*Applied Biosystems, Warrington, UK*) y analizados con el paquete informático GeneMapper (*Applied Biosystems, Warrington, UK*).

3.2.4.4. Análisis de ligamiento

Para estimar los valores de *LOD Score* de cada familia se utilizó el software easyLINKAGE Plus v5.05 (Lindner TH y Hoffmann K, 2005). Se asumió una frecuencia génica de 0.0001 para por tratarse de una enfermedad rara con una incidencia de 1:10000 nacidos, y se definieron 3 clases susceptibles a la aparición de la enfermedad. Las penetrancias génicas definidas fueron 0'40, 0'80 y 0'99 para los grupos de edades de 0 a 30, 30 a 60, y más de 60 años respectivamente.

3.2.4.5. Reacciones de amplificación de los genes candidatos del locus 1

Siguiendo los criterios de inclusión establecidos para la selección de los genes candidatos explicados en el apartado 1.2, se han secuenciado los siguientes genes:

3.2.4.5.1. Reacciones de amplificación y secuenciación del gen NCU

Para la búsqueda de mutaciones en el gen NCU (*GeneID: 112770*) fueron incluidas 33 familias de MCKD y 9 familias de NI asociada a otros fenotipos. La detección de mutaciones en los 42 individuos se obtuvo a partir de la secuenciación directa de los productos de PCR del gen, amplificados con cebadores que flanqueantes de los 6 exones (*Tabla 3.7.1.*) y regiones UTR (5' y 3'). La PCR fue optimizada en función de la temperatura de hibridación y tiempo de extensión de cada cebador.

PCR 1. Exón 1

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng ADN genómico y 12 pmol de cada cebador. El programa de amplificación fue optimizado con las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización y 70°C durante 3 minutos de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

PCR 2. Exones 2-3

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 ng ADN genómico y 10 pmol de cada cebador. Se ha utilizado DMSO (2% del contenido) para evitar la amplificación de fragmentos inespecíficos. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C durante 3 minutos y 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 57°C durante 45 segundos de hibridación y 72°C un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

PCR3. Exón 4

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng ADN genómico y 8 pmol de cada cebador. Se ha utilizado DMSO (2% del contenido) para evitar la amplificación de fragmentos inespecíficos. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C durante 3 minutos y 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 57°C durante 45 segundos de hibridación y 72°C un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

Tabla 3.7.1. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación del gen NCU, tamaño de las PCR en pares de bases y temperaturas de anillamiento y tiempo en grados centígrados y segundos respectivamente.

<i>Cebadores</i>	<i>Secuencia 5'→3'</i>	<i>Tamaño PCR (pb)</i>	<i>Tª A. (°C)</i>	<i>T.E (seg.)</i>
<i>Exón 1</i>	ACCCTCTGGCACCTCTTCCG	303	70	180
	TGACCATCTCCCACACCCTCC			
<i>Exón 2-3</i>	TGCCTGTGTCTCTCCTTGGTCC	401	57	60
	CCCACCCTCACAAATCAGCC			
<i>Exón 4</i>	TGGTTGAATGAGTTTTAGGAGGG	391	57	60
	GGCTGATTTGTGAGGGTGGG			
<i>Exón 5-6</i>	TTTTTACAGAGGAGGGATTGAGG	757	57	60
	GGAACCTTGATGCTCCAACCTCC			

PCR 4. Exones 5-6

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 ng ADN genómico y 10 pmol de cada cebador, se han adicionado 1U de *Taq* polimerasa para fragmentos ricos en CG y 5µL de solución Q para mejorar la amplificación. El programa de amplificación fue optimizado con las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 57°C durante 45 segundos de hibridación y 72°C un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

3.2.4.5.2. Reacciones de amplificación y secuenciación del gen APOA1-BP

Para la búsqueda de mutaciones en el gen APOA1-BP fueron incluidas 33 familias de MCKD y 9 familias de NI asociada a otros fenotipos. La detección de mutaciones en los 42 individuos se obtuvo a partir de la secuenciación directa de los productos de PCR del gen, amplificados con cebadores que flanqueantes de los 6 exones (Tabla 3.7.2.) y regiones UTR (5' y 3'). La PCR fue optimizada en función de la temperatura de hibridación y tiempo de extensión de cada cebador.

PCR 1. Exón 1

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng ADN genómico y 12 pmol de cada cebador. El programa de amplificación fue optimizado con las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización y 70°C durante 3 minutos de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

Tabla 3.7.2. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación del gen APOA1-BP, tamaño de las PCR en pares de bases y temperaturas de anillamiento y tiempo en grados centígrados y segundos respectivamente.

Cebadores	Secuencia 5'→3'	Tamaño PCR (pb)	Tª A. (°C)	T.E (seg.)
Exón 1	ACCCTCTGGCACCTCTTCCG	303	70	180
	TGACCATCTCCCACACCCTCC			
Exón 2-3	TGCCTGTGTCTCTCCTTGGTCC	401	57	60
	CCCACCCTCACAAATCAGCC			
Exón 4	TGGTTGAATGAGTTTTAGGAGGG	391	57	60
	GGCTGATTTGTGAGGGTGGG			
Exón 5-6	TTTTTACAGAGGAGGGATTGAGG	757	57	60
	GGAACCTTGATGCTCCAACCTCC			

PCR 2. Exones 2-3

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH

8.3), 75 ng ADN genómico y 10 pmol de cada cebador. Se ha utilizado DMSO (2% del contenido) para evitar la amplificación de fragmentos inespecíficos. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C durante 3 minutos y 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 57°C durante 45 segundos de hibridación y 72°C un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

PCR3. Exón 4

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng ADN genómico y 8 pmol de cada cebador. Se ha utilizado DMSO (2% del contenido) para evitar la amplificación de fragmentos inespecíficos. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C durante 3 minutos y 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 57°C durante 45 segundos de hibridación y 72°C un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

PCR 4. Exones 5-6

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 ng ADN genómico y 10 pmol de cada cebador, se han adicionado 1U de *Taq* polimerasa para fragmentos ricos en CG y 5µL de solución Q para mejorar la amplificación. El programa de amplificación fue optimizado con las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 57°C durante 45 segundos de hibridación y 72°C un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

3.2.4.5.3. Reacciones de amplificación y secuenciación del gen EFNA1

Para la búsqueda de mutaciones en el gen EFNA1 fueron incluidas 33 familias de MCKD y 9 familias de NI asociada a otros fenotipos. La detección de mutaciones en los 42 individuos se obtuvo a partir de la secuenciación directa de los productos de

PCR del gen, amplificados con cebadores que flanqueantes de los 6 exones (*Tabla 3.7.3.*) y regiones UTR (5' y 3'). La PCR fue optimizada en función de la temperatura de hibridación y tiempo de extensión de cada cebador.

PCR 1. 5'-UTR y Exón 1

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng ADN genómico y 12 pmol de cada cebador. Se ha utilizado DMSO (2% del contenido) para evitar la amplificación de fragmentos inespecíficos. El programa de amplificación fue optimizado con las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C durante 3 minutos y 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 64°C durante 30 segundos de hibridación y 72°C un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

PCR 2. Exones 2-3

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 ng ADN genómico y 10 pmol de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C durante 3 minutos y 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 64°C durante 30 segundos de hibridación y 72°C un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

PCR3. Exón 4

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng ADN genómico y 8 pmol de cada cebador. Se ha utilizado DMSO (2% del contenido) para evitar la amplificación de fragmentos inespecíficos. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C durante 3 minutos y 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 68°C durante 30 segundos de hibridación y 72°C un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

Tabla 3.7.3. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación del gen EFNA1, tamaño de las PCR en pares de bases y temperaturas de anillamiento y tiempo en grados centígrados y segundos respectivamente.

Cebadores	Secuencia 5'→3'	Tamaño PCR (pb)	Tª A. (°C)	T.E (seg.)
5'-UTR y Exón 1	TCAAGAGCCTGTTCGCACGG	1285	64	30
	CAGAGAGAAGGAAGGGAAGGG			
Exones 2-3	TCGGAAAAATCTCTTGGGGTC	737	64	30
	CCAGGTCATTTTCCCAAGGC			
Exón 4	GAAGGATGAAATGTGGGGAGG	951	68	30
	GTCTCCACTTCTTTCTCCATCCC			
Exones 5 y 3'-UTR	GCCACTTTCAGAGCCCCCAG	1127	62	30
	AACTTTCCCTCCCAGCCTCC			

PCR 4. Exones 5 y 3'-UTR.

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 ng ADN genómico y 10 pmol de cada cebador. Se ha utilizado DMSO (2% del contenido) para evitar la amplificación de fragmentos inespecíficos. El programa de amplificación fue optimizado con las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos de desnaturalización, 62°C durante un minuto y 30 segundos de hibridación y 72°C dos minutos de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

3.2.4.5.4. Reacciones de amplificación y secuenciación del gen EFNA3

Para la búsqueda de mutaciones en el gen EFNA3 fueron incluidas 33 familias de MCKD y 9 familias de NI asociada a otros fenotipos. La detección de mutaciones en los 42 individuos se obtuvo a partir de la secuenciación directa de los productos de PCR del gen, amplificados con cebadores que flanqueantes de los 6 exones (Tabla 3.7.4.) y regiones UTR (5' y 3'). La PCR fue optimizada en función de la temperatura de hibridación y tiempo de extensión de cada cebador.

PCR 1. 5'-UTR y Exón 1

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng ADN genómico y 12 pmol de cada cebador. El programa de amplificación fue optimizado con las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 64°C durante 45 segundos para el anillamiento y 72°C durante un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

PCR 2. Exón 2

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng ADN genómico y 12 pmol de cada cebador. El programa de amplificación fue optimizado con las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 66°C durante 30 segundos para el anillamiento y 72°C durante un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

Tabla 3.7.4. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación del gen EFNA3, tamaño de las PCR en pares de bases y temperaturas de anillamiento y tiempo en grados centígrados y segundos respectivamente.

Cebadores	Secuencia 5'→3'	Tamaño PCR (pb)	Tº A. (ºC)	T.E (seg.)
5'-UTR y Exón 1	TGACTCTCTCCTTGACCCCCTC	1174	64	45
	GGTGGGACTATGGGACAGGG			
Exón 2	TTATGGGGGATGGA GGAGG	1199	66	30
	GCAGGTTGTGAGTGGGCGTG			
Exón 3-4-5	GACGGGGACAGTTTGGAGGG	822	70	30
	GCTCCCTGCTCCTTCCAAGC			
Exón 5 y 3'-UTR	AGAAGAGCATCAGCGGGACC	1135	68	30
	ACCAGTGTAACAGAAGGGTGATGG			
Secuencia				
EFNA3FS	GGGGGCTTCAGGTCACCAGC	700	60	180

PCR3. Exones 3 y 4

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng ADN genómico y 12 pmol de cada cebador. El programa de amplificación fue optimizado con las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 70°C durante 30 segundos para el anillamiento y 72°C durante un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

PCR 4. Exones 5 y UTR

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng ADN genómico y 12 pmol de cada cebador. El programa de amplificación fue optimizado con las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 68°C durante 30 segundos para el anillamiento y 72°C durante un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

3.2.4.5.5. Reacciones de amplificación y secuenciación del gen ADAM15

Para la búsqueda de mutaciones en el gen ADAM15 fueron incluidas 33 familias de MCKD y 9 familias de NI asociada a otros fenotipos. La detección de mutaciones en los 42 individuos se obtuvo a partir de la secuenciación directa de los productos de PCR del gen, amplificados con cebadores que flanqueantes de los 23 exones (*Tabla 3.7.5.*) y regiones UTR (5' y 3'). La PCR fue optimizada en función de la temperatura de hibridación y tiempo de extensión de cada cebador.

PCR 1. UTR 5' y Exón 1

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng ADN genómico y 12 pmol de cada cebador. Esta PCR tiene un elevado contenido en GC al incluir la región promotora y el 5'-UTR, por lo que se necesita adicionar 1 unidad de *Taq* polimerasa especial para regiones con elevado contenido en GC y solución Q, para impedir el anillamiento con regiones específicas. El programa de amplificación fue optimizado con las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización y 64°C durante 45 segundos de hibridación y 72°C durante un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

PCR 2. Exones 2 y 3

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng de ADN genómico y 12 pmol de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C durante 3 minutos y 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 66°C durante 30 segundos de hibridación y 72°C durante un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

PCR3. Exón 4, 5 y 6

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng de ADN genómico y 12 pmol de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C durante 3 minutos y 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 66°C durante 30 segundos de hibridación y 72°C durante un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

PCR 4. Exones 7, 8, 9 y 10

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng de ADN genómico y 12 pmol de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C durante 3 minutos y 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 66°C durante 30 segundos de hibridación y 72°C durante un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

PCR 5. Exones 11, 12, 13 y 14

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng de ADN genómico y 12 pmol de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C durante 3 minutos y 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 66°C durante 30 segundos de hibridación y 72°C durante un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

PCR 6. Exones 14, 15 y 16

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng de ADN genómico y 12 pmol de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C durante 3 minutos y 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 66°C durante 30 segundos de hibridación y 72°C durante un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

PCR 7. Exones 17 y 18

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng de ADN genómico y 12 pmol de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C durante 3 minutos y 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 66°C durante 30 segundos de hibridación y 72°C durante un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

Tabla 3.7.5. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación del gen ADAM15, tamaño de las PCR en pares de bases y temperaturas de anillamiento y tiempo en grados centígrados y segundos respectivamente.

Cebadores		Secuencia 5'→3'	Tamaño PCR (pb)	Tª A. (°C)	T.E (seg.)
Exón 1	S	GAAGCTACTAGGGAGGGGTCC	927	64	60
	A	CGCAGAGGATGACCAGGCAG			
Exones 2-3	S	ATTGGGAGGGAGTGGGAACC	1347	66	60
	A	GCTGTGTGACCTGGGGCAAG			
Exones 4-6	S	CTTGCCCCAGGTCACACAGC	1082	66	60
	A	GTGGCTGGAAC TACGGGTGC			
Exones 7-10	S	TACTTCCTGGTCCTCCTTGGC	1302	66	60
	A	TCCACCACAATGCCAGACC			
Exones 11-14	S	GGAACAGGAGCAGAGAGGGTG	1351	66	60
	A	ATGGCATCTCTGTGGGGAGG			
Exones 14-16	S	CGTTGTGCCTCCTATGCCCAG	1178	66	60
	A	TGAGTAATGTTTGAGCCTGGGAGGC			
Exones 17-18	S	TACACACATACCCAAGCACAACCC	767	66	60
	A	TAGCAATCCAGCCACCCAC			
Exones 19-20	S	TAACCCCACTCAGGGATGGC	991	66	60
	A	GTAGAAACCAAGGCAGGAGGC			
Exones 21-23	S	TGACCTACACCTTCCTCCCCTG	1380	66	60
	A	GCCAATGGTCAGAGTGGGGAC			
Secuencia					
ADAM2R	A	GTGGAGATGGATGGGTTGGG	700	60	180
ADAM3F	S	ACCTTCCTTGACCTCCGCAC	700	60	180
ADAM12R	A	CGGGCATCAGAGCAGGTGG	700	60	180
ADAM22F	S	GTGCCCATCGGGTGACCTGC	700	60	180

PCR 8. Exones 19 y 20

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng de ADN genómico y 12 pmol de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C durante 3 minutos y 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 66°C durante 30 segundos de hibridación y 72°C durante un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

PCR 9. Exones 21, 22, 23 y 3'-UTR

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng de ADN genómico y 12 pmol de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C durante 3 minutos y 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 66°C durante 30 segundos de hibridación y 72°C durante un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

3.2.4.5.6. Reacciones de amplificación y secuenciación del gen DPM3

Para la búsqueda de mutaciones en el gen DPM3 fueron incluidas 33 familias de MCKD y 9 familias de NI asociada a otros fenotipos. La detección de mutaciones en los 42 individuos se obtuvo a partir de la secuenciación directa de los productos de PCR del gen, amplificados con cebadores flanqueantes de la región promotora, 5'-UTR, exón 1 y 3'-UTR (*Tabla 3.7.6.*). La PCR fue optimizada en función de la temperatura de hibridación y tiempo de extensión de cada cebador.

PCR 1. Promotor, 5'-UTR, Exón 1 y 3'-UTR

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng de ADN genómico y 12 pmol de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C durante 3 minutos y 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 66°C durante 30 segundos de hibridación y 72°C durante un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

Tabla 3.7.6. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación del gen DPM3, tamaño de las PCR en pares de bases y temperaturas de anillamiento y tiempo en grados centígrados y segundos respectivamente.

Cebadores	Secuencia 5'→3'	Tamaño PCR (pb)	Tª A. (°C)	T.E (seg.)
5'-UTR, Exón 1 y 3'-UTR	GATGTCCTCAAGCCCCACGC	1008	66	30
	TCCTTGGGAGCAAAAATGGG			

3.2.4.5.7. Reacciones de amplificación y secuenciación del gen CCT3

Para la búsqueda de mutaciones en el gen CCT3 fueron incluidas las 33 familias de MCKD. La detección de mutaciones se obtuvo a partir de la secuenciación directa de los productos de PCR del gen, amplificados con cebadores flanqueantes de los exones 12 y 13 (Tabla 3.7.7). Las PCRs fueron optimizadas en función de la temperatura de hibridación y tiempo de extensión de cada cebador.

PCR 1. Exones 12 y 13

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng de ADN genómico y 12 pmol de cada cebador, se adicionó una unidad de *Taq* polimerasa especial para regiones con elevado contenido en GC y solución Q, para impedir el anillamiento con regiones específicas. Las condiciones de amplificación

fueron: un ciclo de 95°C durante 5 minutos y 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 65°C durante 30 segundos de hibridación y 72°C durante un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

Tabla 3.7.7. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de los exones 12 y 13 del gen CCT3, tamaño de la PCR en pares de bases y temperatura de anillamiento y tiempo en grados centígrados y segundos respectivamente.

Cebadores	Secuencia 5'→3'	Tamaño PCR (pb)	Tª A. (°C)	T.E (seg.)
Exón 12-13	AGGGGTGGAATAGGTTATGGC	1324	65	30
	CCTGTAAGTCCAGCACTTTGGG			

3.2.4.5.8. Reacciones de amplificación y secuenciación del gen SCAMP3

Para la búsqueda de mutaciones en el gen SCAMP3 fueron incluidas las 33 familias de MCKD. La detección de mutaciones se obtuvo a partir de la secuenciación directa de los productos de PCR del gen, amplificados con cebadores flanqueantes de los exones 1, 2 y región 5'-UTR (Tabla 3.7.8.). Las PCRs fue optimizadas en función de la temperatura de hibridación y tiempo de extensión de cada cebador.

Tabla 3.7.8. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación del promotor, región 5'-UTR, exón 1 y exón 2 del gen SCAMP3, tamaño de la PCR en pares de bases y temperatura de anillamiento y tiempo en grados centígrados y segundos respectivamente.

Cebadores	Secuencia 5'→3'	Tamaño PCR (pb)	Tª A. (°C)	T.E (seg.)
5'-UTR, Exón 1 y Exón 2	TCAGAAGGCTCCCGTCGTCC	1163	64	30
	AACTCCAACCCAGCCCCAACC			

PCR 1. Promotor, 5'-UTR, Exón 1 y Exón 2

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng de ADN genómico y 12 pmol de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C durante 5 minutos y 30 ciclos de 94°C durante

30 segundos de desnaturalización, 64°C durante 30 segundos de hibridación y 72°C durante un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

3.2.4.5.9. Reacciones de amplificación y secuenciación del gen AK000210

Para la búsqueda de mutaciones en el gen AK000210 fueron incluidas las 33 familias de MCKD. La detección de mutaciones se obtuvo a partir de la secuenciación directa de los productos de PCR del gen, amplificados con cebadores flanqueantes del exón 9 (Tabla 3.7.9.). La PCR fue optimizada en función de la temperatura de hibridación y tiempo de extensión de cada cebador.

PCR 1. Exón 9

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng de ADN genómico y 12 pmol de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C durante 5 minutos y 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos de desnaturalización, 64°C durante 30 segundos de hibridación y 72°C durante un minuto de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

Tabla 3.7.9. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación del exón 9 del gen AK000210, tamaño de la PCR en pares de bases y temperatura de anillamiento y tiempo en grados centígrados y segundos respectivamente.

Cebadores	Secuencia 5'→3'	Tamaño PCR (pb)	Tª A. (°C)	T.E (seg.)
Exón 9	TAGTCTCAAACCCTGGCAGT	1162	64	30
	CCACCCTGATGAGTCAAGCCT			

3.2.4.6. Purificación enzimática

Los fragmentos de PCR fueron evaluados en geles de agarosa (al 1% - 2% en función del tamaño del fragmento) y purificados por medio de digestión con *Exonucleasa I* (*Exo I*) y *Fosfata Alcalina de camarón* (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) (*USB, Cleveland, OH*) para eliminar cadenas de hebras simples de copias del ADN molde, cebadores y dinucleótidos restantes no utilizados durante la reacción de PCR. Las condiciones de purificación de la PCR fueron realizadas añadiendo a 5 µL de muestra 1 U de *ExoI* y 2 µL de *SAP* con un ciclo a 37°C para la activación enzimática de digestión nucleotídica y defosforilación durante 15 minutos seguido de un ciclo a 80°C durante quince minutos para la inactivación.

3.2.4.7. Reacción de secuenciación

La reacción de secuenciación de los fragmentos de la PCR se realizó usando un paquete comercial de secuencia *Big Dye Terminator* versión 1.0 (*Applied Biosystem*) de acuerdo con las recomendaciones de la compañía. Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 5 µl con 1 µl de *Big Dye*, 1,5 pmol de cada cebador y 2,5 µl de producto de PCR purificada. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 96°C durante cinco minutos y 30 ciclos de 96°C durante 15 segundos de desnaturalización, 60°C durante 3 minutos de acoplamiento y extensión y un último paso a 60°C extensión durante 10 minutos.

3.2.4.8. Precipitación de las reacciones de secuenciación.

Las reacciones de secuencia fueron precipitadas por el método *EDTA/Etanol solution* para placas de 96 pocillos. Para ello se mezclan 5µL de reacción de secuencia con 2,5 µL de EDTA 125mM con 30 µL de etanol absoluto (100%). Se deja incubar a temperatura ambiente al menos 1cinco minutos para precipitar los fragmentos de secuencia.

Se centrifuga a 1400-2000 $\times g$ durante cuarenta y cinco minutos o 2000-3000 $\times g$ durante treinta minutos y se retira el sobrenadante invirtiendo la placa sobre una toalla de papel en la base para absorber el sobrenadante y se centrifuga a 180 $\times g$ durante un minuto.

Se realiza un lavado de las muestras precipitadas en la base de los pocillos con etanol al 70%, para ello se adicionan 30 μl de la solución sin tocar la base de los pocillos. Agitar 15 segundos y centrifugar quince minutos a 1650 $\times g$. Retirar el sobrenadante nuevamente invirtiendo la placa con una centrifugación de 185 $\times g$ durante un minuto.

Secar a temperatura ambiente en oscuridad durante 2 horas para eliminar los restos de etanol o en estufa durante 1 hora.

Finalmente las muestras se resuspenden en 10 μl de formamida.

Las muestras fueron analizadas en el Secuenciador Automático *ABI3130xl* (*Applied Biosystems, Warrington, UK*) y analizadas con el paquete informático *Sequencing Analysis v5.2*.

3.2.4.9. Análisis de Inmunohistoquímica anti-THP, anti-Metargidina

La inmunohistoquímica pertenece a un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten identificar una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados. Estas técnicas se basan en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos. Esta reacción es visible cuando el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración. En las técnicas de inmunoperoxidasa se utilizan como marcadores enzimas capaces de hacer cambiar de color un sustrato incoloro. Las enzimas más frecuentemente utilizadas son peroxidasa y fosfatasa alcalina y los sustratos diaminobenzidina (color pardo), aminoetilcarbazon (color rojo) y nitroazul de tetrazolio (color azul). Estos marcadores pueden conjugarse directamente al anticuerpo primario o bien indirectamente mediante otros anticuerpos secundarios o sustancias como biotina o proteína A.

El material histológico (colon como control positivo y riñón) fue procesado mediante fijación en formaldehído e inclusión en parafina en el servicio de Anatomía Patológica del complejo.

Se analizaron los anticuerpos primarios anti-THP (*Biomedical Technologies, Stoughton, MA, USA*) a 1:200 y 1:300 y anti-ADAM15 (H-60) (*Santa Cruz Biotechnology, USA*) anti-conejo policlonal contra los aminoácidos 561-620 de la metargidina.

Se realizaron cortes a 5 micras.

Se utilizó como recuperador antigénico el calor mediante olla a presión en una solución de buffer-citrato a pH 6,5 durante 4 minutos.

El tiempo de incubación con el anticuerpo primario fue de 30 minutos a temperatura ambiente.

El procedimiento de visualización utilizado fue *Envision*. Se usó diaminobenzidina como cromógeno y contratinción con hematoxilina.

Las secciones de parafina fueron montadas en portas *DAKO ChemMate Capillary Gap Microscope Slides (DAKO A/S BioTek Solutions, USA)*, secados en

estufa a 50°C durante 24 horas y sometidos en 4 inmersiones de xilol de 3 minutos cada una para desparafinar.

Se realizó un lavado en etanol absoluto y etanol al 96% con una duración de 30 segundos

Finalmente se rehidrató en un baño de agua destilada.

El revelado antigénico fue realizado por calor en olla a presión durante dos minutos en solución tampón de citrato de sodio con 0,01 mol/L de trisodio citrato.

A continuación se realizó un lavado salino con tampón Tris a pH 7 e incubado con anticuerpo monoclonal IgG1 anti-ratón.

Tras la incubación con el anticuerpo primario la inmunodetección fue realizada mediante Ig biotinilada anti-ratón seguida de estreptavidina-biotina peroxidasa unida (*LSAB-DAKO, Glostrup, Denmark*) con el cromógeno diaminobenzidina como sustrato. Todas las inmunotinciones han sido realizadas en un inmuno-analizador automático TechMate 500 (*DAKO*).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. ANÁLISIS DE LIGAMIENTO CROMOSÓMICO DE FAMILIAS MCKD AL LOCUS 1q21 y 1q41

3.3.1.1 Familia MCKD 3

Se posee información de los 6 individuos afectados y se dispone de ADN de los individuos *II.3*, *II.4*, *II.5*, *II.6*, *II.8*, *III.1*, *III.2*, *III.3*, *III.4*, *III.5* y *III.6*. En cuanto a la historia clínica de la familia, no se conocen datos de hiperuricemia en ningún miembro afecto ni tampoco se tiene conocimiento de episodios de artritis gotosa. Los individuos *II.3*, *II.4* y *II.5* desarrollaron *IRCT* a las edades de 41, 27 y 42 años respectivamente. De los individuos de la tercera generación se sabe que al menos el individuo *III.1* es afecto, de los demás no se tiene información clínica o todavía no han manifestado la enfermedad.

Ligamiento al locus 1q21

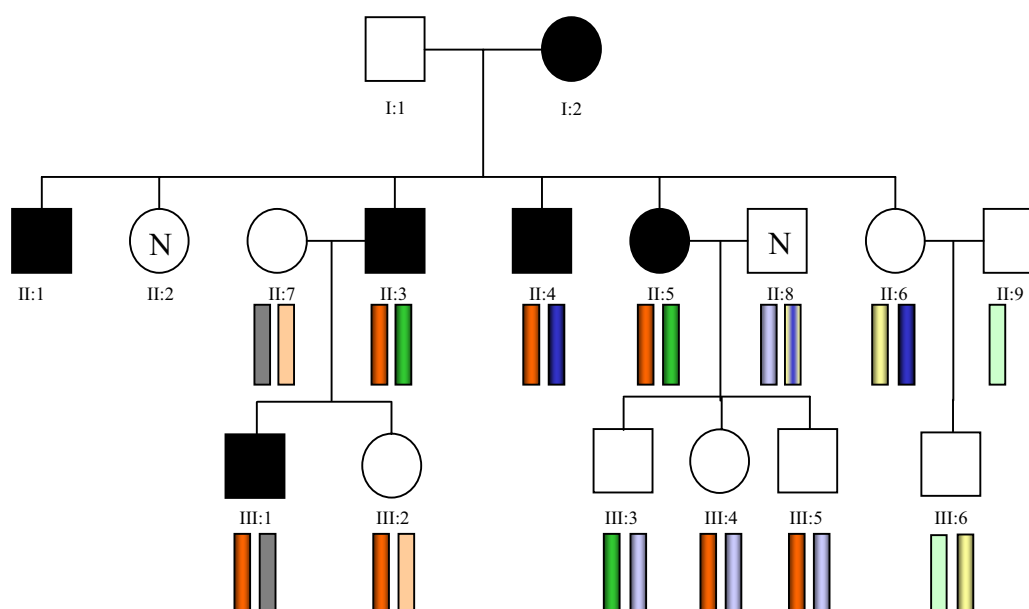


Figura 3.6.1. Pedigrí genealógico de la familia 3 con los haplotipos del locus 1.

Tabla 3.8.1. Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 3 para la familia 3.

	II.3		II.4		II.5		II.6		II.8		
DIS498	3	3	3	3	3	3	3	3	1	2	
DIS2715	2	7	2	2	2	7	2	2	2	7	
DIS1595	8	6	8	7	8	6	6	7	6	8	
DIS2125	5	5	5	6	5	5	5	6	5	6	
DIS1653	4	4	4	4	4	4	2	4	3	3	
	III.1		III.2		III.3		III.4		III.5		III.6
DIS498	3	4	3	2	1	3	1	3	1	3	3
DIS2715	2	2	2	7	2	7	2	2	2	2	2
DIS1595	8	3	8	8	6	6	6	8	6	8	6
DIS2125	5	2	5	5	5	5	5	5	5	6	5
DIS1653	4	4	4	4	3	4	3	4	3	4	4

El análisis de microsatélites esta región (*Figura 3.6.1*) muestra que los 4 individuos afectados comparten haplotipo (*Tabla 3.8.1*), y que los individuos *III.2*, *III.4* y *III.5* comparten el haplotipo ligado a la enfermedad, por lo que probablemente con el tiempo desarrollarán la enfermedad.

Ligamiento al locus 1q41

Tabla 3.8.2. Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 3 para la familia 3.

	II.3		II.4		II.5		II.6		II.8			
DIS3470	3	10	2	10	3	10	2	9	9	10		
DIS1660	3	4	1	4	3	4	1	2	6	4		
DIS1723	1	6	3	6	1	6	3	4	1	5		
DIS245	2	6	1	6	2	6	1	5	9	3		
DIS425	4	3	3	3	4	3	3	6	2	6		
DIS217	3	3	3	3	3	3	3	6	7	6		
DIS419	9	7	9	7	9	7	9	5	5	12		
DIS2141	7	4	7	4	7	4	7	1	1	1		
DIS1644	6	2	5	2	6	2	5	5	6	3		
	III.1		III.2		III.3		III.4		III.5		III.6	
DIS3470	3	10	3	1	10	10	3	10	3	2	9	
DIS1660	3	5	3	1	4	4	3	4	3	1	4	
DIS1723	1	4	1	2	5	6	5	1	5	1	3	
DIS245	6	2	6	4	3	6	3	6	3	2	1	
DIS425	3	5	3	3	6	3	6	3	6	4	6	
DIS217	3	1	3	6	6	3	6	3	6	3	6	
DIS419	7	7	7	14	12	7	12	7	12	9	5	10
DIS2141	4	8	4	7	1	4	1	4	1	7	1	7
DIS1644	2	6	2	6	3	2	3	2	3	6	5	6

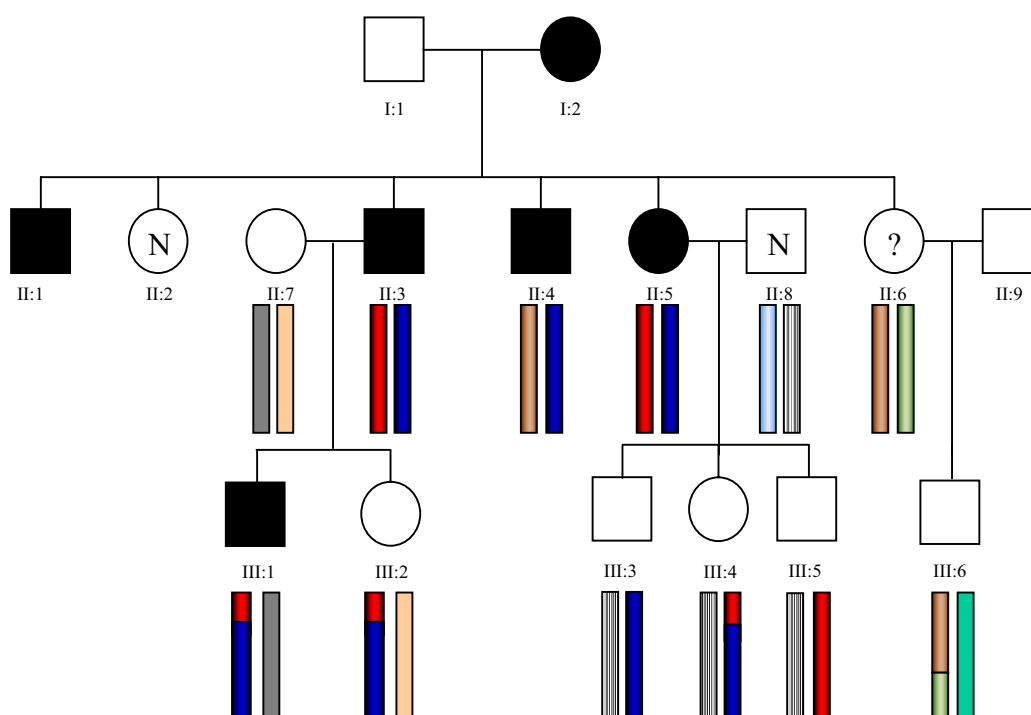


Figura 3.6.2. Pedigrí genealógico de la familia 3 con los haplotipos del locus 3.

Una vez analizados los marcadores microsatélite se puede comprobar que los individuos *II.3*, *II.4* y *II.5* comparten haplotipo (*Figura 3.6.2*) (en azul), lo mismo sucede con los individuos de la tercera generación *III.1*, *III.2*, *III.3* y *III.4*, en los cuales se produjo una recombinación de las cromátidas hermanas durante la meiosis que reduce el tamaño de la región a 25 cM delimitada por los marcadores *DIS1723* y *DIS1644*, región aún así bastante amplia y con demasiados genes como para llevar a cabo la estrategia de secuenciación directa de genes candidatos.

3.3.1.2. Familia MCKD 6

Pequeña familia de la que sólo se dispone de muestra de tres individuos, dos afectados (*II.1*, *III.4*) y un sano *III.2*, que actualmente con 43 años no presenta sintomatología clínica. El individuo *III.6* entró en diálisis con tan sólo 35 años, con hiperuricemia y artritis gotosa desde la edad de 30 años. El individuo *II.1* presenta IRC

con comportamiento intersticial, desarrollando *IRCT* a la edad de 43 años y episodios de gota desde temprana edad. Entre los afectados existen algunos que presentan quistes pero no se dispone de datos concretos.

Ligamiento al locus 1q21

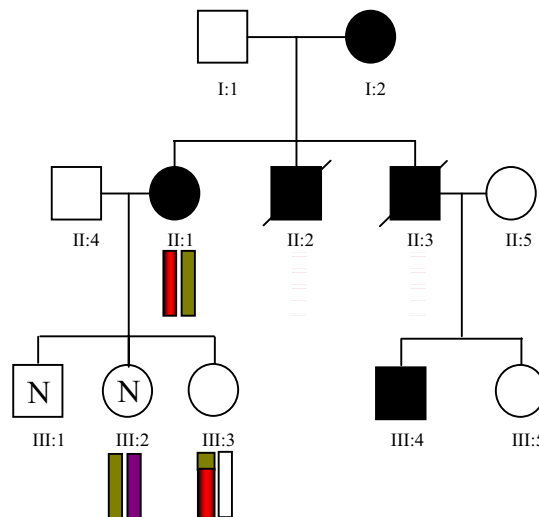


Figura 3.6.3. Pedigrí genealógico de la familia 6 con los haplotipos del locus 1. Debido a su pequeño tamaño no se puede concluir si existe ligamiento o no a la enfermedad.

El haplotipo (2 2 6 5 3) está presente en los dos individuos afectados, y el alelo 2 recombinado; el haplotipo (3 2 1 5 4) del II:1 está compartido con III:2 sano, por lo que se descarta como ligado a la enfermedad (Figura 3.6.3.). El valor de *LODscore* no es significativo (LOD: 0,2218, θ : 0,0) debido al pequeño tamaño de la familia; en el caso de que ligue al locus 1, el evento de recombinación del individuo III:4 acota la región a 4 cM aproximadamente.

Tabla 3.8.3. Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 1 para la familia 6.

	II.1	III.2	III.4
<i>DIS498</i>	2	3	3
<i>DIS2715</i>	2	2	7
<i>DIS152</i>	6	1	7
<i>DIS2125</i>	5	5	2
<i>DIS1653</i>	3	4	3

Ligamiento al locus 1q41

En el estudio de haplotipos en el locus 3 se ve (Figura 3.6.4.) que los tres individuos comparten un único haplotipo y puesto que el individuo III.2 es sano se puede concluir que no existe ligamiento al locus 3 (LOD: 0,1249, θ : 0,0).

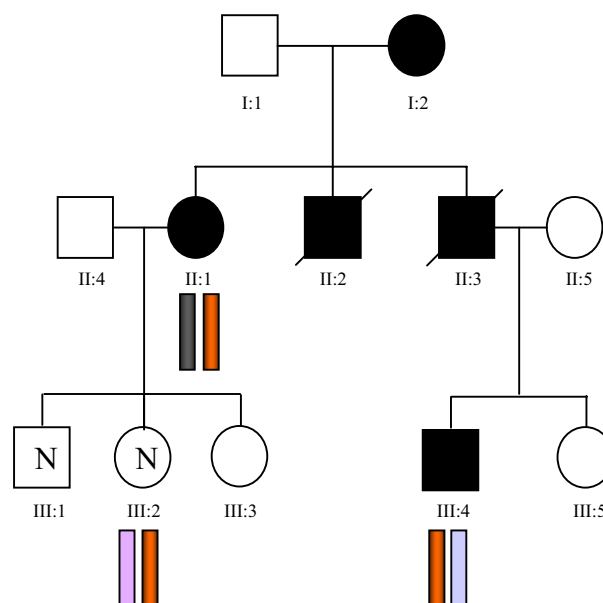


Figura 3.6.4. Pedigrí genealógico de la familia 6 con los haplotipos del locus 3.

Tabla 3.8.4. Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 3 para la familia 6.

	II.1		III.2		III.4	
DIS3470	2	10	2	10	10	3
DIS1660	2	1	3	1	1	2
DIS1723	5	6	4	6	6	5
DIS245	3	7	3	7	7	3
DIS425	5	3	5	3	3	4
DIS217	7	7	7	7	7	7
DIS419	11	11	11	11	11	10
DIS2141	8	1	7	1	1	8
DIS1644	6	5	2	5	5	5

3.3.1.3. Familia MCKD 7

Aunque se conoce la existencia de diversos individuos afectados en esta familia, sólo se dispone de información clínica del individuo II.1. Debuta por primera vez a los 30 años, donde se detecta tras una analítica que presenta IR, pero no es hasta los 62 años cuando, con niveles de creatinina en suero de 5 mg/dL desarrolla insuficiencia renal crónica terminal. Como rasgo clínico relevante presenta nefropatía perdedora de sal y

ausencia de quistes renales en las ecografías realizadas hasta el momento. Su hermana tiene actualmente 70 años sin manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Ligamiento al locus 1q21

Tabla 3.8.5. Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 1 para la familia 7.

	II.1		II.2		II.3	
D1S498	3	2	3	2	1	4
D1S2715	2	8	2	8	2	3
D1S1595	7	7	7	7	6	4
D1S2125	5	6	5	6	5	6
D1S1653	3	4	3	4	4	3

	II.1		II.2	
D1S498	3	2	3	2
D1S2715	2	8	2	8
D1S1595	7	7	7	7
D1S2125	5	6	5	6
D1S1653	3	4	3	4

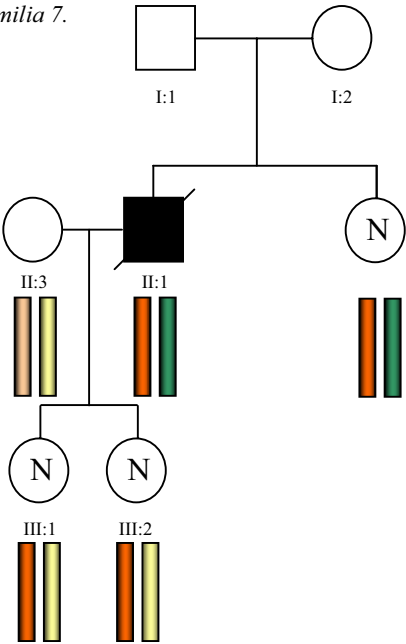


Figura 3.6.5. Pedigrí genealógico de la familia 7 con los haplotipos del locus 1 donde se observa la ausencia de ligamiento.

El estudio de los marcadores microsatélite para el locus 1 en esta familia revela que el caso índice comparte ambos haplotipos (Figura 3.6.5) con su hermana sana, por lo que se concluye que esta región no liga con la enfermedad (LOD: 0,0000, θ : 0,0).

Ligamiento al locus 1q41

El estudio de los marcadores microsatélite para el locus 3 en esta familia nos proporciona unos haplotipos (Tabla 3.8.6) en los que claramente se puede ver que el haplotipo 3 3 4 6 1 6 7 6 7 es compartido por un individuo sano, por lo que se descarta el ligamiento (LOD: 0,0000, θ : 0,0).

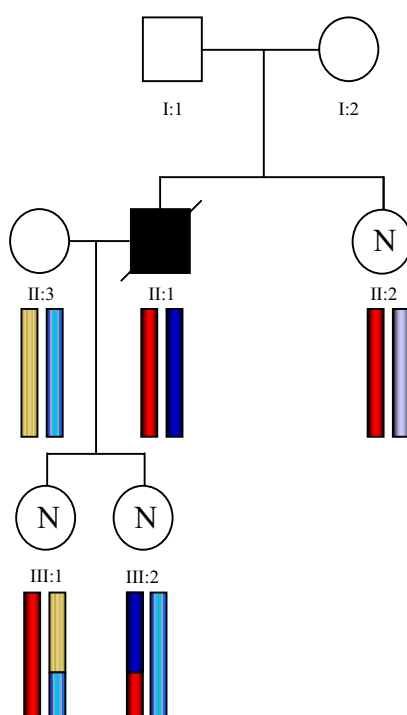


Figura 3.6.6. Pedigrí genealógico de la familia 7 con los haplotipos del locus 3. Esta familia presentó ligamiento con valor máximo de 0,000 al locus 3 ($\theta = 0$).

3.8.6. Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 3 para la familia 7.

	II.1		II.2		II.3		III.1		III.2	
D1s3470	3	11	3	11	3	2	3	2	11	3
D1s1660	3	5	3	2	2	3	3	3	5	2
D1s1723	4	5	4	7	1	4	4	4	5	1
D1s245	6	3	6	3	4	4	6	4	3	3
D1s425	1	8	1	8	3	3	1	3	1	3
D1s217	6	4	6	4	7	6	6	7	6	7
D1s419	7	11	7	11	11	7	7	11	7	11
D1s2141	6	6	6	6	8	8	6	8	6	8
D1s1644	7	6	7	7	6	6	7	6	7	6

En cuanto al haplotipo **1 1 5 5 3 8 4 11 6 6** (en rojo), el evento de recombinación descartaría un fragmento grande. Debido al pequeño tamaño de la familia no se puede concluir ningún tipo de ligamiento.

3.3.1.4. Familia MCKD 11

Familia canaria (Hospital Universitario de Tenerife) diagnosticada de nefropatía intersticial. Se dispone de ADN de 16 individuos, tres de ellos afectados. No se dispone de datos concretos de cada paciente, aunque se sabe que existe un fenotipo familiar con hiperuricemia y artritis gotosa, habiéndose descartado por ecografía abdominal la presencia de quistes renales.

Ligamiento al locus 1q21

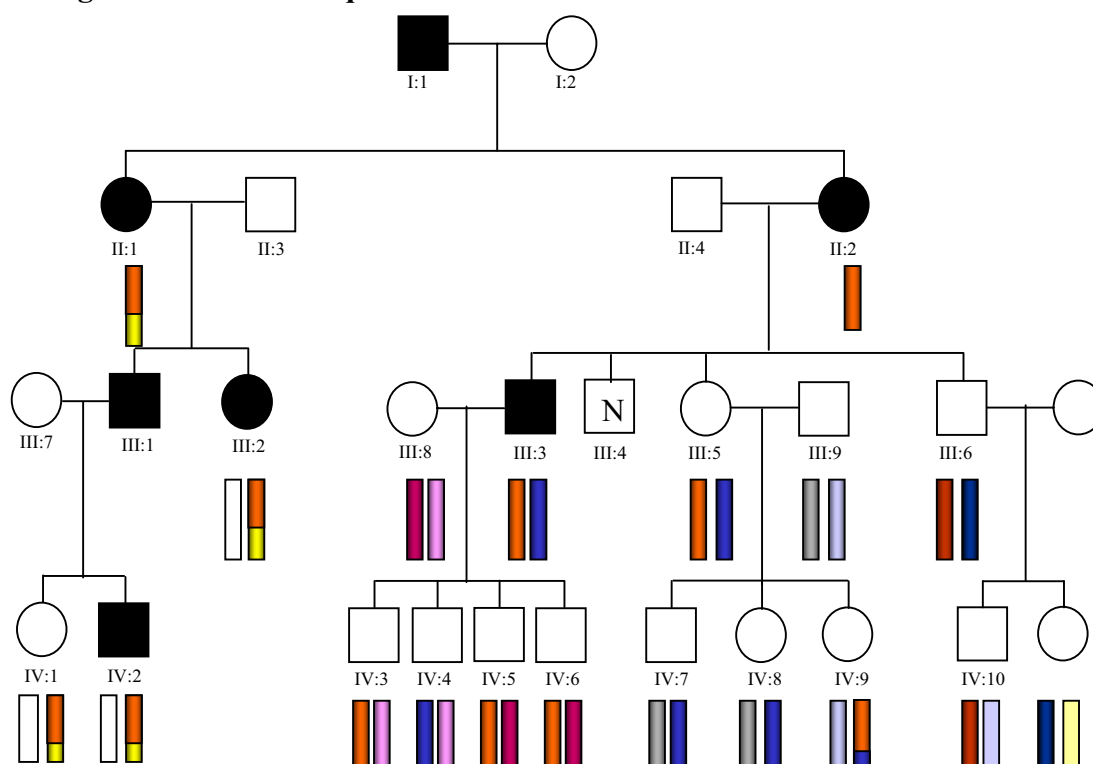


Figura 3.6.7. Pedigrí genealógico de la familia 11 con los haplotipos del locus 1.

Tras el estudio de los marcadores microsatélite para esta región, en esta familia no se puede confirmar que realmente exista ligamiento (LOD: 0,1261, θ : 0,0) (Fig. 3.6.7.); parece que existe un haplotipo común a todos los afectados (3 2 6), aunque existen individuos sanos o sin manifestaciones clínicas que también lo comparten.

Tabla 3.8.7. Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 1 para la familia 11.

	III.2		III.3		III.5		III.6		III.8							
DIS498	3	3	3	4	3	4	4	4	3	3						
DIS2715	2	7	2	7	2	7	1	7	2	7						
DIS1595	6	6	6	6	6	6	5	6	6	2						
DIS2125	5	5	6	6	6	6	4	5	5	2						
DIS1653	3	4	3	4	3	4	3	4	2	4						
	IV.1		IV.2		IV.3		IV.4		IV.5		IV.6		IV.7		IV.8	
DIS498	2	3	2	3	3	3	4	3	3	3	3	3	4	3	4	
DIS2715	5	2	2	2	2	7	7	7	2	2	2	2	7	2	7	
DIS1595	4	6	6	6	6	2	6	2	6	6	6	6	6	6	6	
DIS2125	5	5	5	5	6	2	6	2	6	5	6	5	7	6	7	
DIS1653	4	3	2	3	3	4	4	4	3	2	3	2	4	4	4	
	IV.9		IV.10		IV.11											
DIS498	3	3	4	4	4	2										
DIS2715	2	2	1	7	7	7										
DIS1595	6	6	5	8	6	6										
DIS2125	7	6	4	5	5	5										
DIS1653	5	4	3	3	4	4										

Ligamiento al locus 1q41

Tabla 3.8.8. Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 3 para la familia 11.

	III.2		III.3		III.5		III.6		III.8		IV.1		IV.2		IV.3	
DIS3470	2	11	2	11	2	2	11	2	11	1	3	1	2	2	2	2
DIS1660	4	5	4	2	4	5	4	2	3	2	1	4	3	3	4	3
DIS1723	4	7	4	4	4	5	4	4	1	4	1	8	4	8	4	1
DIS245	9	5	9	3	9	3	9	3	3	6	5	8	5	5	9	3
DIS425	3	4	9	3	9	8	9	3	3	3	4	6	3	8	9	3
DIS217	3	6	1	3	1	6	1	3	1	6	2	3	6	7	1	1
DIS419	11	11	14	9	14	7	14	9	8	3	3	11	9	10	14	8
DIS2141	1	9	1	8	1	1	8	5	7	1	8	5	5	5	1	5
DIS1644	1	5	5	5	5	5	5	5	7	1	1	1	6	7	5	7
	IV.4		IV.5		IV.6		IV.7		IV.8		IV.9		IV.10		IV.11	
DIS3470	2	11	11	2	2	2	2	9	2	2	2	2	9	2	9	9
DIS1660	4	2	2	3	4	3	5	5	5	5	5	5	4	5	4	5
DIS1723	4	4	4	1	4	1	5	5	4	5	5	5	4	5	4	5
DIS245	9	6	3	3	9	3	9	3	3	3	9	9	3	4	3	8
DIS425	9	3	3	3	9	3	5	8	3	8	5	9	3	4	3	4
DIS217	1	6	3	1	1	1	8	6	6	6	8	1	3	1	3	6
DIS419	14	3	9	8	14	8	11	7	9	7	11	14	9	1	9	11
DIS2141	1	7	8	5	1	5	4	1	1	4	1	8	1	8	6	6
DIS1644	5	1	5	1	5	7	3	5	5	3	5	5	5	1	5	6

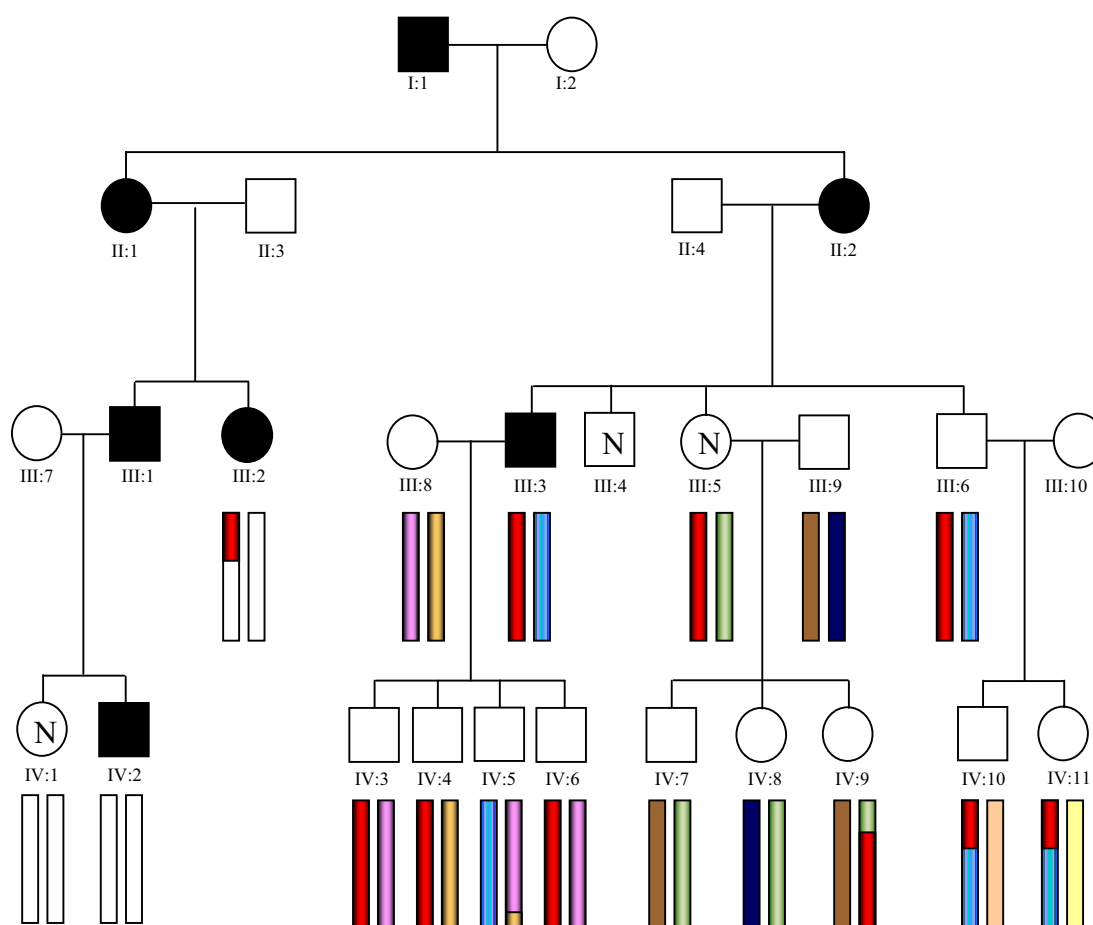


Figura 3.6.8. Pedigrí genealógico de la familia 11 con los haplotipos del locus 3.

En cuanto a los datos para el *locus* 3 en esta familia se puede observar que no existe ligamiento a este *locus* (LOD: 0,0190, θ : 0,0) ya que los tres individuos afectados de los que tenemos datos no tienen el mismo haplotipo en común.

3.3.1.5. Familia MCKD 13

En esta familia sólo se posee información de dos afectados, el individuo II.3 y el individuo III.2, aunque existen evidencias de enfermedad renal en la familia por vía materna. El individuo II.3 manifestó episodios de artritis gotosa con 40 años (niveles de ácido úrico 8,7 mg/dL), con insuficiencia renal a los 40 años. En la ecografía abdominal se observó ausencia de quistes en el riñón derecho y 4 quistes en el riñón izquierdo en el tercio medio y tercio superior, el mayor de ellos de 2,4x1,8 cm. El grosor del

parénquima aparentaba normal con ecogenia normal. En las ecografías de los hermanos no se detectaron quistes en el riñón, aunque si mostraban quistes en el hígado. En el individuo *III.2* se observó un único quiste en el riñón derecho de 7 mm sin otros hallazgos significativos a la edad de 12 años, por lo que se podría considerar como afecto, del individuo *III.1* no se tienen evidencias clínicas

Ligamiento al locus 1q21

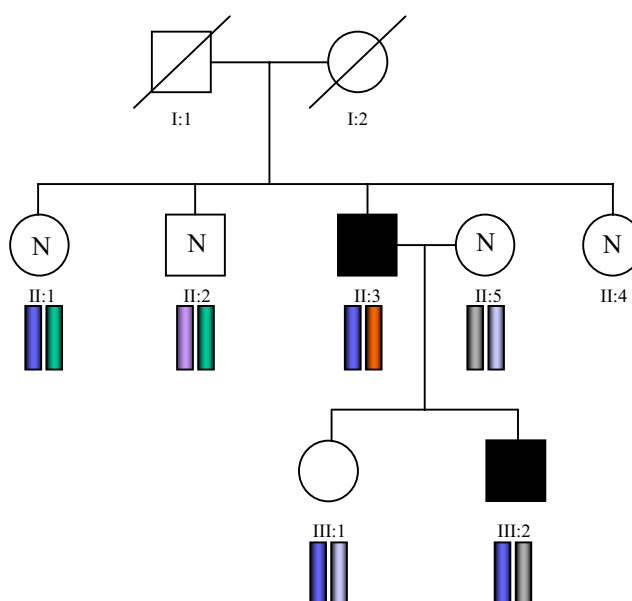


Figura 3.6.9. Pedigrí genealógico de la familia 13 con los haplotipos del locus 1.

Los individuos *II.3* y *III.2* comparten el mismo haplotipo (3 7 7 1 4), compartido también por el individuo *II.1* sano (Figura 3.6.9.), por lo que se descarta el ligamiento en esta familia para el locus 1.

Tabla 3.8.9. Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 1 para la familia 13.

	<i>II.1</i>		<i>II.2</i>		<i>II.3</i>		<i>II.5</i>		<i>III.1</i>		<i>III.2</i>	
<i>DIS498</i>	3	4	4	6	3	3	3	4	3	4	3	3
<i>DIS2715</i>	7	7	7	2	7	6	3	3	7	3	7	3
<i>DIS1595</i>	7	6	6	4	7	4	4	7	7	7	7	4
<i>DIS2125</i>	1	5	5	5	1	1	6	4	1	4	1	6
<i>DIS1653</i>	4	3	3	3	4	3	5	4	4	4	4	5

No se dispone de más ADN de los individuos de esta familia, por lo que de momento no se han analizado los marcadores microsatélite definidos para el locus 3.

3.3.1.6. Familia MCKD 15

Actualmente ningún miembro de la familia presenta insuficiencia renal. El individuo *II.3* con 45 años presenta episodios de gota severa desde los 18 y elevados niveles de ácido úrico en sangre. Los demás individuos de la generación tienen de 60 a 30 años, y ninguno de ellos ha manifestado síntomas de la enfermedad. En cuanto a los antecedentes familiares se puede decir que el individuo *I.1* falleció a los 82 años de edad, los individuos *I.3* y *I.4* tienen 76 y 78 años respectivamente, el individuo *I.3* presenta hipertensión arterial, ácido úrico en sangre de 9,3 mg/dL y creatinina 1 mg/dL en suero. El individuo *I.4*, con creatinina de 1,1 mg/dL en suero y ácido úrico de 7,7 mg/dL, sufrió un accidente vascular-cerebral. No se dispone de más datos fenotípicos y los detallados nos hacen pensar en la posibilidad de que la enfermedad del caso índice se herede por vía materna.

Ligamiento al locus 1q21

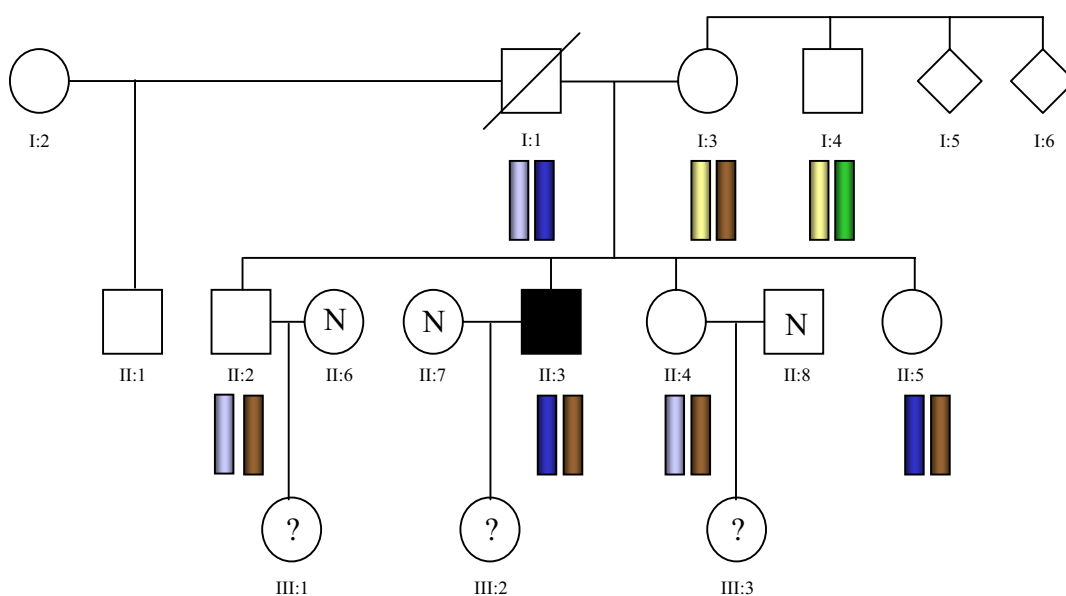


Figura 3.6.10. Pedigrí genealógico de la familia 15 con los haplotipos del locus 1.

Tabla 3.8.10. Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 1 para la familia 15.

	I.3		I.4	
DIS498	2	4	2	1
DIS2715	2	7	2	5
DIS1595	6	6	6	7
DIS2125	6	6	6	5
DIS1653	2	3	2	4

	II.2		II.3		II.4		II.5	
DIS498	4	4	4	4	4	4	4	4
DIS2715	7	7	3	7	7	7	3	7
DIS1595	4	6	6	6	4	6	6	6
DIS2125	5	6	5	6	5	6	5	6
DIS1653	2	3	3	3	2	3	3	3

En cuanto al estudio de los marcadores microsatélite, se ve que si ligan al locus 1 el *I.3* y *I.4*, de los que se duda sean afectados, no comparten haplotipos (*Tabla 3.8.11*) con el individuo *II.3* afecto. Por otro lado el individuo *II.3* comparte el haplotipo paterno con su hermana *II.5*. No se puede determinar si existe ligamiento o no en esta familia al locus 1; en caso que fuese positivo, la enfermedad sería heredada por vía paterna.

Ligamiento al locus 1q41

Tabla 3.8.11. Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 3 para la familia 15.

	I.3		I.4	
DIS3470	1	9	3	9
DIS1660	2	3	3	4
DIS1723	5	4	1	5
DIS245	6	3	6	6
DIS425	5	6	3	8
DIS217	1	3	1	1
DIS419	13	5	1	5
DIS2141	5	6	1	7
DIS1644	6	6	6	6

	II.2		II.3		II.4		II.5	
DIS3470	9	10	9	10	1	10	9	10
DIS1660	3	4	3	4	2	4	3	4
DIS1723	4	1	4	1	5	4	4	1
DIS245	3	6	3	6	6	6	3	6
DIS425	6	3	6	3	5	6	6	3
DIS217	3	1	3	6	1	1	3	6
DIS419	5	5	5	10	13	5	5	10
DIS2141	6	5	6	4	5	5	6	4
DIS1644	6	3	6	1	6	3	6	1

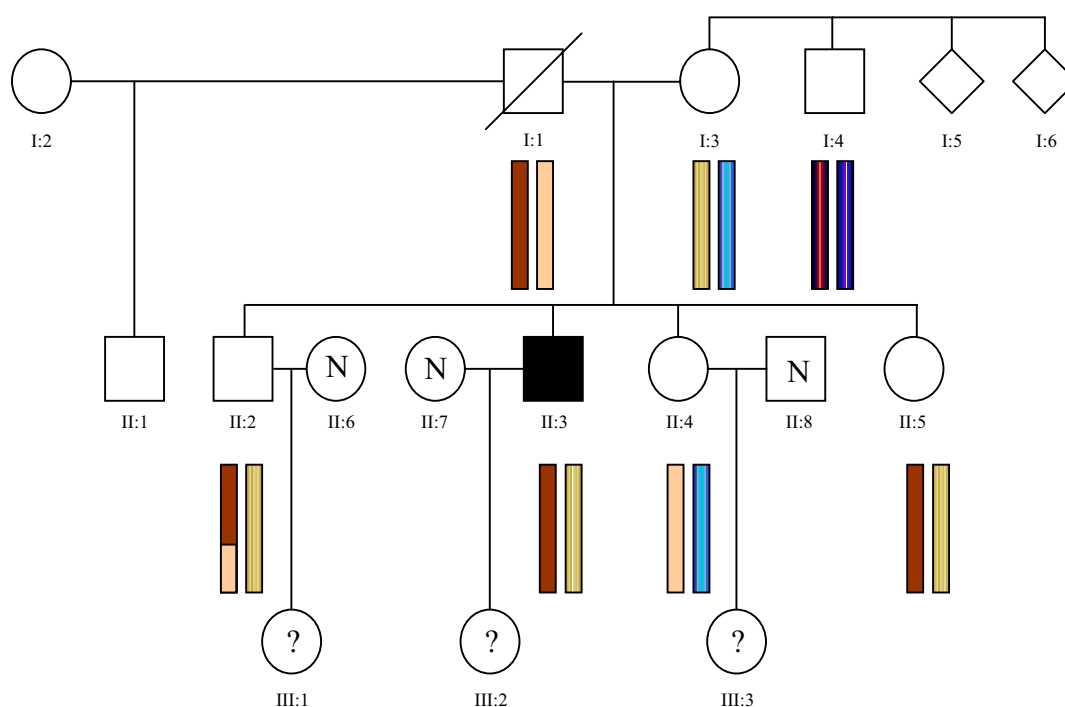


Figura 3.6.12. Pedigrí genealógico de la familia 15 con los haplotipos del locus 3.

El mismo resultado se ha visto en el locus 3, si el individuo *I.3* y *I.4* son afectados no comparten haplotipo con el individuo *II.3* caso índice, por lo que no liga tampoco a esta región. Si por el contrario la transmisión de la enfermedad fuese por vía paterna, el individuo *II.5* manifestará con el tiempo sintomatología clínica (edad actual 30 años) pero con debut más tardío.

3.3.1.7. Familia MCKD 20

Familia procedente de Baltimore (*USA*), diagnosticada como *MCKD* a partir de los datos obtenidos tras el análisis de biopsias renales y analíticas. El tamaño reducido de los riñones está presente en los individuos afectados de la familia, rasgo frecuente en la enfermedad y que facilita el diagnóstico. Es notable también la presencia de quistes detectados por ultrasonografía. La primera manifestación clínica fue la anemia. Ambas hermanas gemelas monocigotas entraron en diálisis a la edad de 30 y 32 años.

Ligamiento al locus 1q21

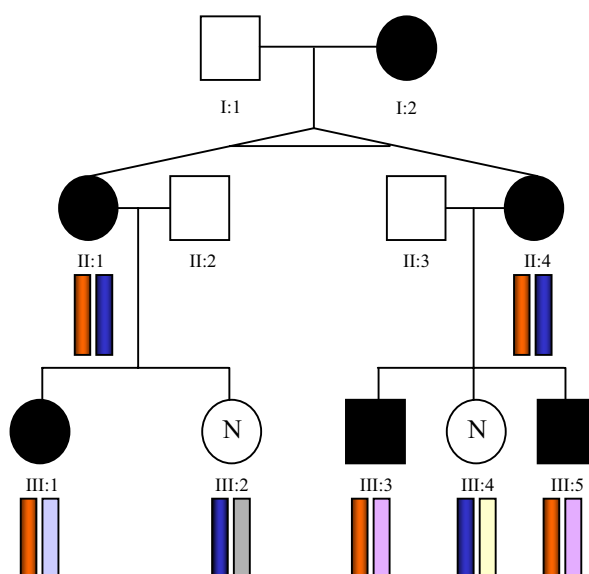


Figura 3.6.12. Pedigrí genealógico de la familia 20 con los haplotipos del locus 1. Esta familia presentó ligamiento con valor máximo de 0,6 ($\theta = 0$).

En cuanto al estudio de los marcadores microsatélite, todos los afectados comparten el mismo haplotipo (3 2 3 4 3) (Figura 3.6.12.), con lo que se puede concluir que existe ligamiento al locus 1 aunque tiene un *LOD Score* de 0,6 ($\theta = 0$).

Tabla 3.8.12. Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 1 para la familia 20.

	II.1		II.4		III.1		III.2		III.3		III.4		III.5				
DIS498	3		1	3	1	3	5	1		1	3	2	1	6	3		2
DIS2715	2		7	2	7	2	7	2	2		7	7	7	7	2		7
DIS1595	3		3	3	3	3	4	3		2	3	4	3		4	3	4
DIS2125	4		2	4	2	4	4	2		3	4	2	2		3	4	2
DIS1653	3		4	3	4	3	6	4		2	3	3	4		3	3	3

3.3.1.8. Familia MCKD 29

El caso índice de esta familia es el individuo *III.2*, de 46 años, con insuficiencia renal crónica y episodios de gota repetitiva desde los 20 años. Lo mismo ocurre en los individuos *III.1* y *III.3*, con 48 y 41 años respectivamente, en insuficiencia renal crónica

con episodios de gota a lo largo de su vida. El individuo *II.1* falleció en hemodiálisis a la edad de 70 años, presentando también episodios de gota a lo largo de su vida; los individuos *II.4* y *II.5* reciben actualmente tratamiento de hemodiálisis. En la última generación, con edades entre 6 y 17 años, ningún individuo presenta todavía síntomas de la enfermedad.

Ligamiento al locus 1q21

Tras el estudio de los marcadores microsatélite se observa que los tres individuos afectados comparten el mismo haplotipo (3 9 8 4 2) (*Figura 3.6.13.*) en la 3ª generación, lo que hace pensar en ligamiento a este locus en esta familia, esperándose que el individuo *IV.7* manifieste la enfermedad en el futuro. El LOD no es significativo (LOD: 0,3010, θ : 0,0) ya que la edad de la cuarta generación impide un correcto establecimiento de las manifestaciones clínicas de los pacientes.

Tabla 3.8.13. Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 1 para la familia 29.

	<i>III.1</i>		<i>III.2</i>		<i>III.3</i>		<i>III.5</i>		<i>III.6</i>		<i>III.8</i>		<i>III.10</i>	
<i>DIS498</i>	3	3	3	3	1	3	1	3	2	4	3	3	2	4
<i>DIS2715</i>	2	9	2	9	5	9	5	7	9	5	1	5	7	2
<i>DIS1595</i>	8	8	8	8	6	8	6	6	6	7	6	6	7	7
<i>DIS2125</i>	5	4	5	4	5	4	5	6	4	4	5	5	5	5
<i>DIS1653</i>	3	2	3	2	2	2	2	3	3	3	4	4	3	4
	<i>VI.1</i>		<i>VI.2</i>		<i>VI.3</i>		<i>VI.6</i>		<i>VI.7</i>		<i>VI.10</i>		<i>VI.11</i>	
<i>DIS498</i>	2	3	4	3	2	3	1	3	3	3	2	3	2	1
<i>DIS2715</i>	9	2	5	2	9	2	5	1	9	1	7	7	7	5
<i>DIS1595</i>	6	8	7	8	6	8	6	6	8	6	7	6	7	6
<i>DIS2125</i>	4	5	4	5	4	5	5	5	4	5	5	6	5	5
<i>DIS1653</i>	3	3	3	3	3	3	2	4	2	4	3	3	3	2

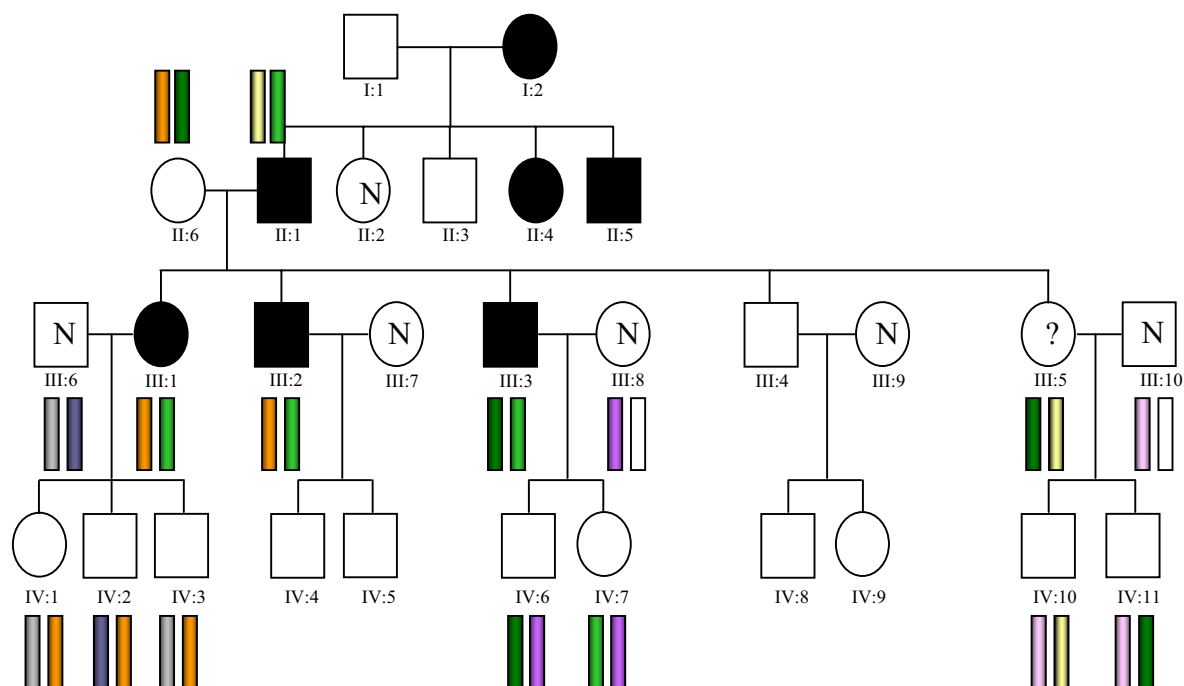


Figura 3.6.13. Pedigrí genealógico de la familia 29 con los alelos de los marcadores microsatélite del locus 1.

Ligamiento al locus 1q41

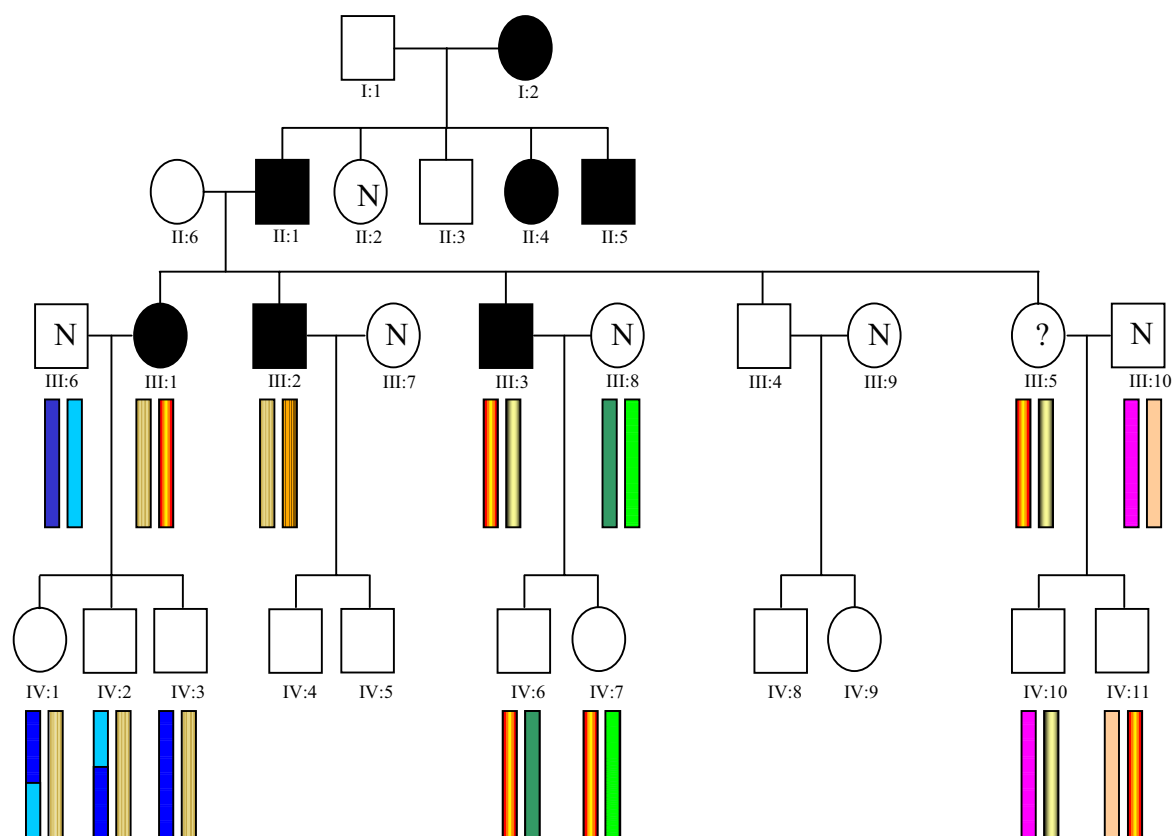


Figura 3.6.14. Pedigrí genealógico de la familia 29 con los alelos de los marcadores microsatélite del locus 3.

El estudio de los marcadores microsatélite para el *locus* 3 en esta familia nos proporciona unos haplotipos (*Figura 3.6.14.*) en los que claramente se ve que no existe ligamiento a este *locus* (LOD: 0,0000, θ : 0,0) ya que los tres individuos afectados de los que tenemos datos no tienen el mismo haplotipo en común.

Tabla 3.8.14. Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al *locus* 3 para la familia 29.

	IV.1		IV.2		IV.3		IV.4		IV.5		IV.6		IV.10	
DIS498	1	4	1	5	1	4	1	4	1	5	1	3	3	4
DIS2715	2	7	2	8	2	2	2	7	2	8	2	7	6	7
DIS1595	4	7	6	8	4	7	4	7	6	8	4	8	6	6
DIS2125	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	1	6
DIS1653	3	4	2	3	3	4	3	4	2	3	3	1	3	3
	V.7		V.8											
DIS498	4	4	3	4										
DIS2715	7	2	6	2										
DIS1595	6	7	6	7										
DIS2125	6	5	1	5										
DIS1653	3	4	3	4										

3.3.1.9. Familia MCKD 33

El individuo *III.2* fallece de una cardiopatía a la edad de 64 años, con elevados niveles de ácido úrico en sangre. Posteriormente, se detecta un nuevo caso en la familia, se trata de un niño que a los pocos meses de su nacimiento desarrolla insuficiencia renal (individuo *V.8*), con elevados niveles de ácido úrico. En las ecografías se observan riñones hiperecogénicos y presenta pérdida salina (40 mL/m³). Como resultado del estudio clínico de la familia se detecta hiperuricemia en el individuo *IV.1* con episodios de artritis gotosa e insuficiencia renal en el individuo *IV.6* sometido a trasplante renal a los 54 años. En la última generación no se conocen más individuos afectados que el individuo *V.8* hasta el momento.

Tras el análisis de los haplotipos en los individuos afectados se puede concluir que no existe ligamiento a este *locus* (*Figura 3.6.15.*), puesto que no existe ninguno que esté compartido por los cuatro.

Ligamiento al locus 1q21

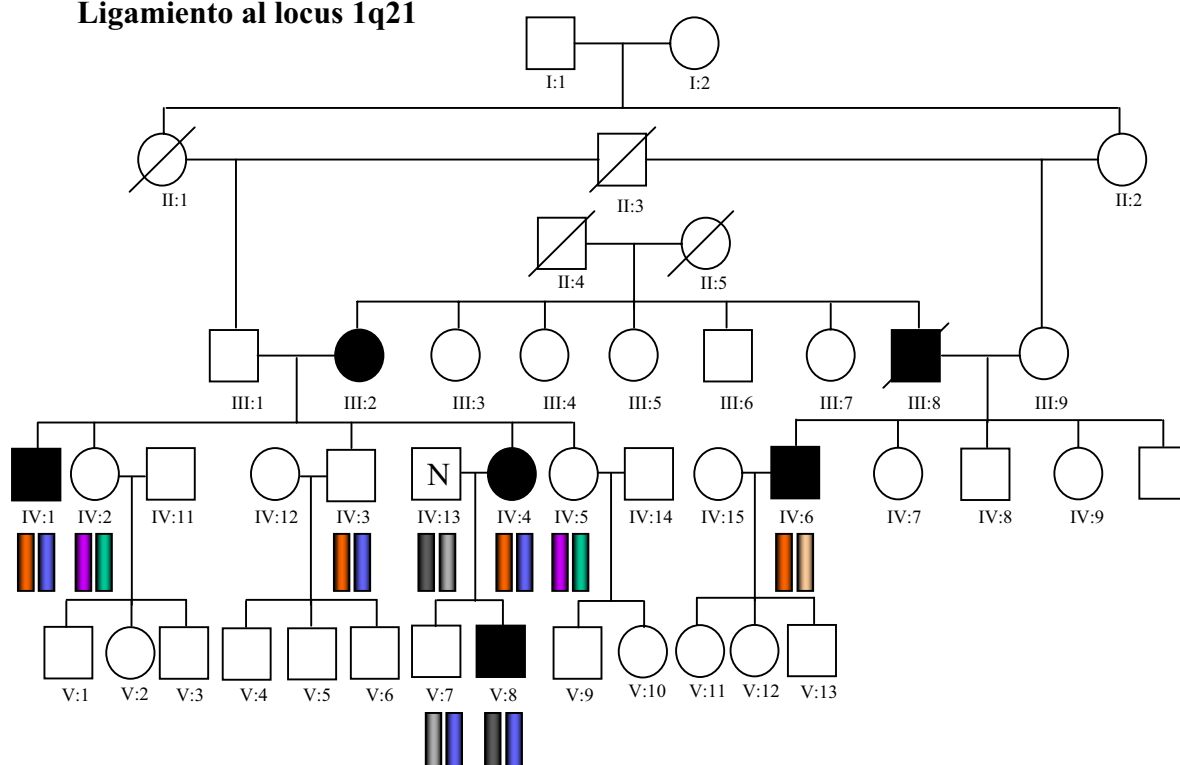


Figura 3.6.15. Pedigrí genealógico de la familia 33 con los alelos de los marcadores microsatélite del locus 1.

Tabla 3.8.15. Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 1 para la familia 33.

	III.1		III.2		III.3		III.5		III.6		III.8		III.10	
<i>DIS3470</i>	1	2	1	2	2	11	2	11	3	10	3	11	2	9
<i>DIS1660</i>	4	1	4	4	4	1	4	1	4	2	4	2	5	2
<i>DIS1723</i>	3	4	4	3	1	4	3	4	3	4	5	4	4	4
<i>DIS245</i>	2	2	2	5	2	2	2	2	3	3	3	8	1	3
<i>DIS425</i>	4	3	4	8	3	4	3	4	4	3	4	6	2	3
<i>DIS217</i>	6	6	6	4	6	6	6	6	1	6	6	7	6	6
<i>DIS419</i>	14	8	14	8	8	14	8	14	5	10	5	5	10	10
<i>DIS2141</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	4	5	4	1	5	5
<i>DIS1644</i>	6	7	6	7	7	6	7	6	1	4	6	5	6	6
	IV.1		IV.2		IV.3		IV.6		IV.7		IV.10		IV.11	
<i>DIS3470</i>	1	3	1	10	1	3	2	3	2	11	11	9	2	2
<i>DIS1660</i>	4	2	4	2	4	2	1	4	1	2	4	2	1	5
<i>DIS1723</i>	3	4	3	5	3	4	4	4	4	4	3	4	4	4
<i>DIS245</i>	2	3	2	3	2	3	2	3	2	8	2	3	2	1
<i>DIS425</i>	4	3	4	3	4	4	3	4	3	6	4	3	3	2
<i>DIS217</i>	6	6	6	1	6	1	6	6	6	7	6	6	6	6
<i>DIS419</i>	14	10	8	5	14	5	8	5	8	5	14	10	8	10
<i>DIS2141</i>	6	5	6	4	6	4	6	4	6	1	6	5	6	5
<i>DIS1644</i>	6	4	7	1	6	1	7	6	7	5	6	6	7	6

Ligamiento al locus 1q41

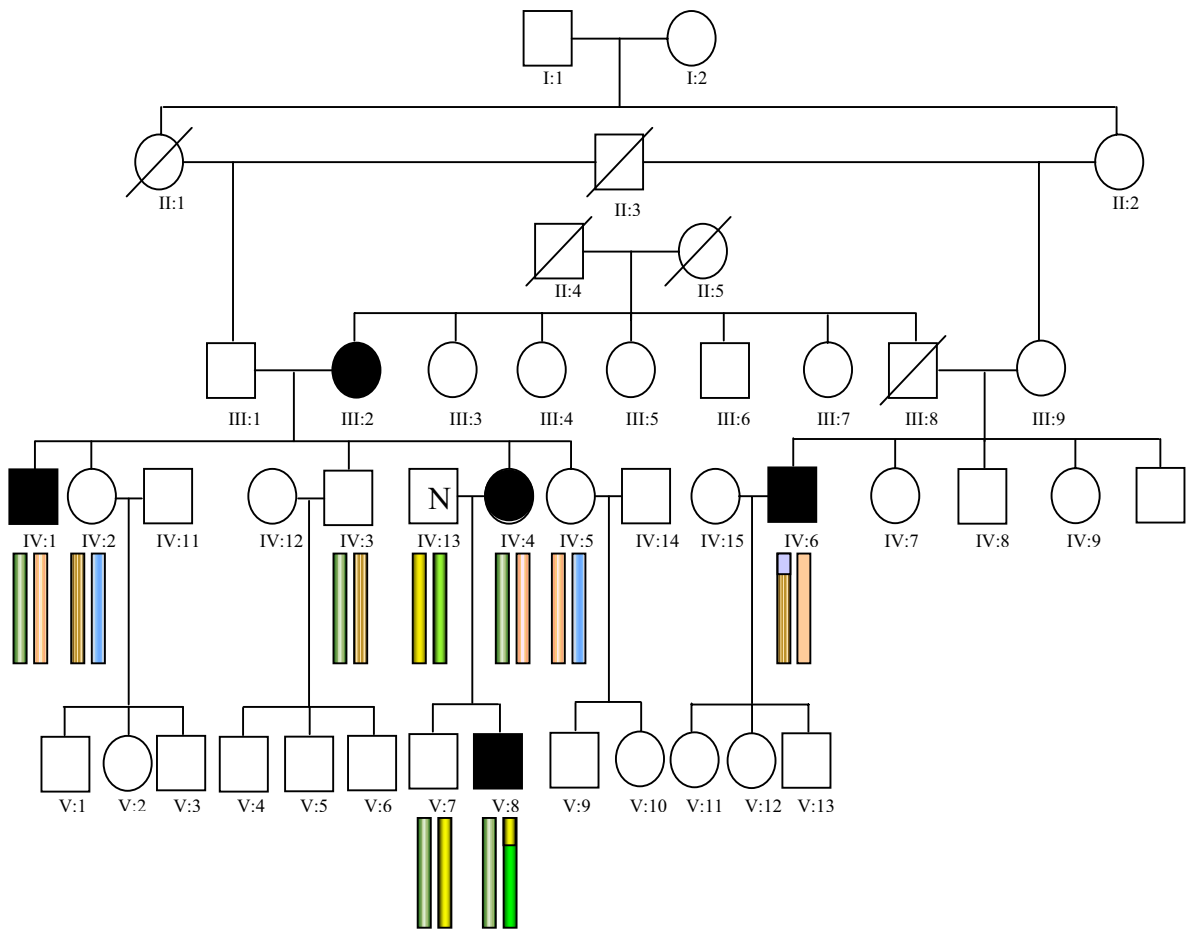


Figura 3.6.16. Pedigrí genealógico de la familia 33 con los alelos de los marcadores microsatélite del locus 3.

El estudio de los marcadores microsatélite para el *locus* 3 en esta familia nos proporciona unos haplotipos (*Tabla 3.8.16.*) en los que claramente se ve que no existe ligamiento a este *locus* ya que los tres individuos afectados de los que tenemos datos no tienen el mismo haplotipo en común.

Tabla 3.8.16. Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 3 para la familia 33.

	IV.1		IV.2		IV.3		IV.4		IV.5		IV.6		IV.13	
DIS3470	1	9	1	9	1	1	1	9	9	9	2	10	3	9
DIS1660	4	4	4	5	4	4	4	4	4	5	1	3	1	4
DIS1723	2	2	4	2	4	2	2	2	2	2	4	1	2	4
DIS245	8	3	7	3	7	8	8	3	3	3	7	10	3	4
DIS425	5	5	7	2	7	5	5	5	5	2	7	4	2	6
DIS217	6	6	6	1	6	6	6	6	6	1	6	1	1	6
DIS419	6	6	5	10	5	6	6	6	6	10	5	10	10	10
DIS2141	4	4	1	6	1	4	4	4	4	6	1	5	5	6
DIS1644	7	6	6	3	6	7	7	6	6	3	6	3	6	6
	V.7		V.8											
DIS3470	1	3	1	3										
DIS1660	4	1	4	1										
DIS1723	2	2	2	2										
DIS245	8	3	8	4										
DIS425	5	2	5	6										
DIS217	6	1	6	6										
DIS419	6	10	6	10										
DIS2141	4	5	4	6										
DIS1644	7	6	7	6										

3.3.1.10. Familia MCKD 34

Pequeña familia con antecedentes familiares por vía materna. El paciente *II.1* entra en diálisis a la edad de 68 años; como sintomatología nefrológica relevante refiere historia de episodios repetitivos de gota e hipertensión arterial. La ecografía abdominal muestra quistes simples en ambos riñones, 7 u 8, el de mayor tamaño de 2-3 cm, con aumento de ecogenicidad del parénquima renal de forma difusa.

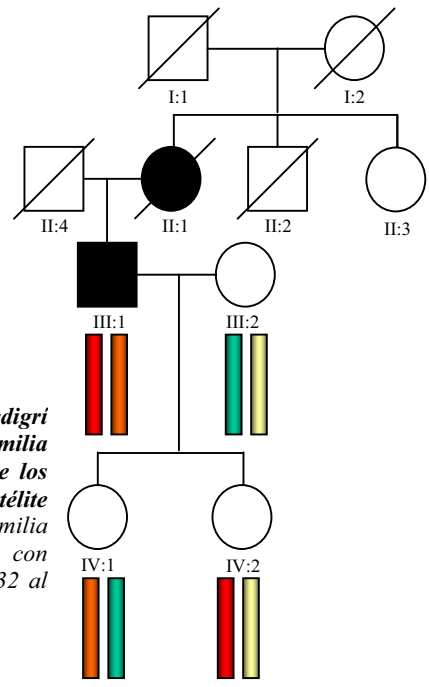
Ligamiento al locus 1q21

Los haplotipos (*Tabla 3.8.17*) de esta familia no nos dan información suficiente de ligamiento, la edad de los individuos impide conocer el posible desarrollo de la enfermedad, aunque clínicamente no se observa ninguna anomalía. El análisis de ligamiento nos ha dado un valor de *LOD* de 0,32 (*MLink*, *LINKAGE*), por lo que no se puede considerar como significativo.

Tabla 3.8.17. Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 1 para la familia 34

	III.1		III.2	
D1S498	4	5	3	3
D1S2715	1	5	7	2
D1S1595	7	4	7	4
D1S2125	5	5	6	6
D1S1653	3	4	2	2
	IV.1		IV.2	
D1S498	5	3	4	3
D1S2715	5	7	1	2
D1S1595	4	7	7	4
D1S2125	5	6	5	6
D1S1653	4	2	3	2

Figura 3.6.17. Pedigri genealógico de la familia 34 con los alelos de los marcadores microsatélite del locus 1. Esta familia presentó ligamiento con valor máximo de 0,32 al locus 1 ($\theta = 0$).

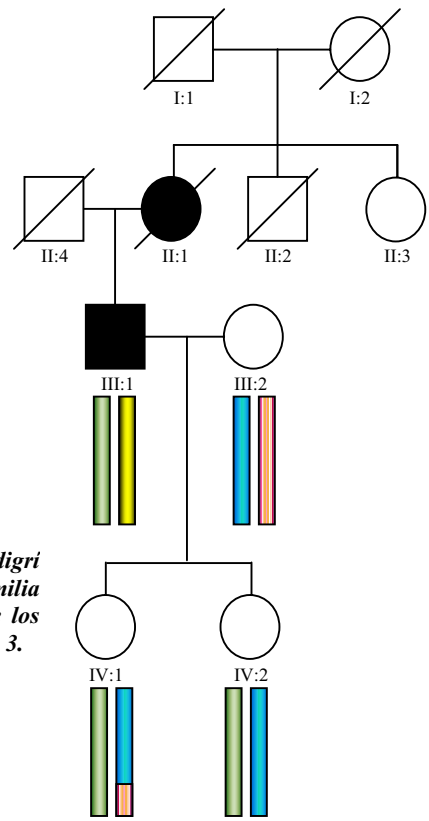


Ligamiento al locus 1q41

Tabla 3.8.18. Relación de los alelos de los distintos marcadores utilizados para determinar el ligamiento al locus 3 para la familia 34.

	III.1		III.2	
D1S3470	8	10	2	1
D1S1660	1	3	2	2
D1S1723	6	5	1	1
D1S245	3	1	2	3
D1S425	5	5	3	3
D1S217	6	3	1	6
D1S419	7	7	1	6
D1S2141	5	5	5	3
D1S1644	1	5	4	5
	IV.1		IV.2	
D1S3470	8	2	8	2
D1S1660	1	2	1	2
D1S1723	6	1	6	1
D1S245	3	2	3	2
D1S425	5	3	5	3
D1S217	6	6	6	1
D1S419	7	6	7	1
D1S2141	5	3	5	5
D1S1644	1	5	1	4

Figura 3.6.18. Pedigri genealógico de la familia 34 con los alelos de los marcadores del locus 3.



Lo mismo sucede para el locus 3, puesto que el tamaño de la familia es pequeño y la información de los individuos de la última generación no aportan indicios de que se traten de individuos sanos no se puede concluir ni la existencia ni la exclusión de ligamiento para esta región.

3.3.2. Correlación genotipo-fenotipo en familias que ligan al locus 1 frente a familias que no ligan

Se han analizado un total de 10 familias de las cuales, al menos 3 ligan a *locus 1* (**F3**, **F20** y **F29**), 3 de ellas no ligan a esta región ni tampoco presentan mutación en el gen *UMOD* (**F7**, **F13** y **F33**), por lo que existen más *loci* implicados en la enfermedad. En cuatro familias (**F6**, **F11**, **F15** y **F34**) no se pudo determinar el ligamiento a la región por ausencia de datos clínicos o porque todavía, debido a su edad, no han manifestado la enfermedad (*Tabla 3.3.2-1*).

Tabla 3.9. Correlación Genotipo-Fenotipo entre familias del locus 1 vs. otros loci. Se analiza la presencia-ausencia de quistes, hiperuricemia, gota e IRCT (Insuficiencia Renal Crónica Terminal). NI. (No Informativo).

Familia	Locus 1	Haplotipo	Fenotipo				Otras manifestaciones
			Quistes	Hiperuricemia	Gota	IRCT	
3	SI	3 2 8 5 4	NO	NO	NO	41, 27, 42	-
29	SI	3 9 8 4 2	NO	SI	SI	65	-
20	SI	3 2 3 4 3	SI	NO	NO	30, 32	Anemia. Riñones de pequeño tamaño
6	N.I	2 2 6 5 3	NO	SI	SI	35, 43	-
11	N.I	3 2 6 - -	NO	SI	SI	-	-
15	N.I	-	NO	SI	SI	-	-
34	N.I	-	SI	SI	SI	68	-
13	NO	-	SI (RI)	SI	SI	-	-
7	NO	-	NO	NO	NO	62	Pérdida salina
33	NO	-	NO	SI	NO	73	Pérdida salina

Tras conocer el ligamiento se pretende establecer una relación entre el locus responsable de la enfermedad con un fenotipo característico, se analizan principalmente

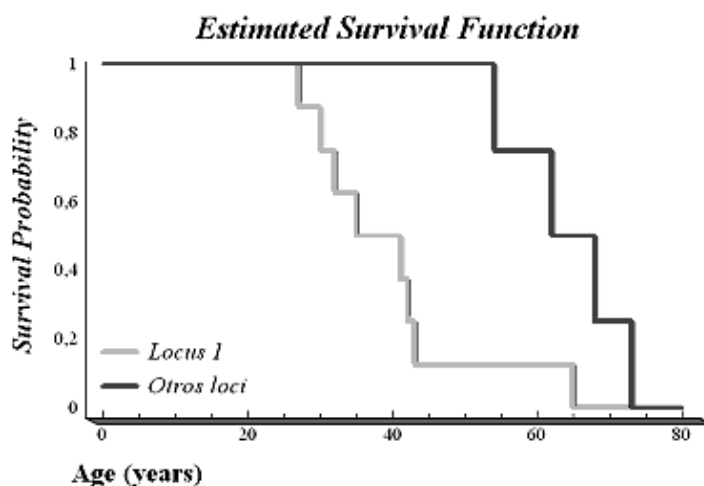
los datos referentes a hiperuricemia y artritis gotosa, muy frecuente en *MCKD*, ausencia o presencia de quistes y presencia de *IRCT*.

Para determinar si existe una diferencia significativa de la entrada en diálisis en función del locus implicado se han elaborado unas curvas de supervivencia (*Statgraphics Plus v5.1*), (*Figura 3.3.2-1*) con el método estadístico *Kaplan-Meier*. La edad media de supervivencia para el grupo 1 (*locus 1*) es de 39,37 años, mientras que para el grupo 2 (*otros loci*), es de 64,25 años. Se han realizado también dos test estadísticos para determinar si es estadísticamente significativa la diferencia entre la probabilidad de supervivencia de ambos grupos:

LogRank Test con $X^2=3,62361$ y $p=0,0569615$;

Wilcoxon Test con $X^2=4,50667$ y $p=0,0337598$, ambos valores de p son inferiores a 0,10 por lo que la diferencia entre ambos grupos es estadísticamente significativa.

Figura 3.7. Curva de supervivencia entre las familias “locus 1” vs. “otros loci”. La supervivencia observada en otros loci es superior a la estimada para las familias del locus 1.



La edad media de supervivencia de los individuos con mutación en el gen *UMOD* (*locus 2*) es de 57,11 (*Figura 3.3.2-2*), y al compararla con las otras dos nos da una $p=0,00692178$ según test estadístico **LogRank** con una X^2 de 9,94617, diferencia entre supervivencia de los tres grupos estadísticamente significativa.

Figura 3.8. Curva de supervivencia entre las familias “locus 1”, “otros loci” y “locus 2”. Aparentemente la severidad de la enfermedad va en función del locus al que esté asociado, se observa una menor supervivencia entre pacientes afectados por el locus 1, mientras que “otros loci” muestran una forma más leve de la enfermedad.

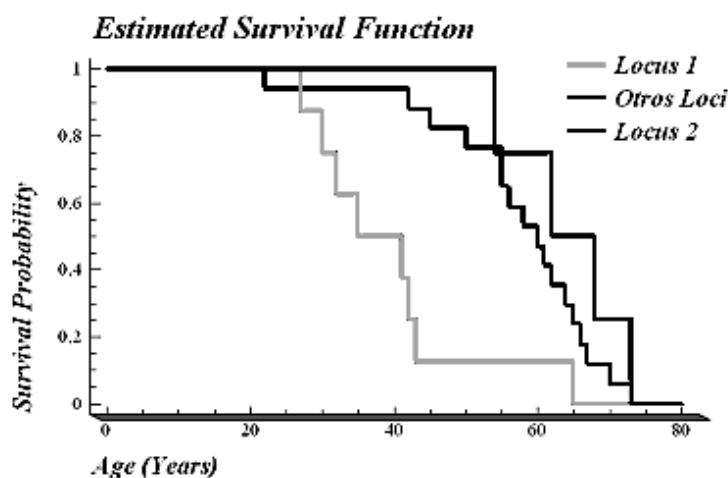
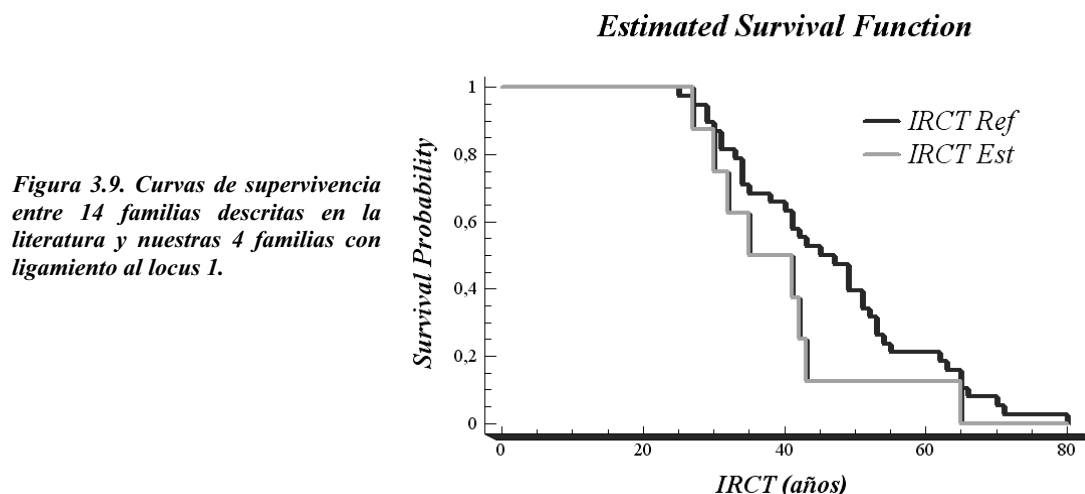


Tabla 3.10. Comparación de IRCTs. Literatura vs cohorte estudiada. M: edad media de IRCT en la familia

Origen	Locus	Familia	Fenotipo			IRCT	Referencias
			Quistes	Hiperuricemia	Gota		
Irak-Israel	1	F1	NO	NO	NO	33, 34, 25, 26, 30, 25, 23, 33, 29, 26, 16	Parvari et al, 2001
Finlandia	1	F1	NO	SI	NO	29, 33, 31, 30, 27, 30, 25	Auranen et al, 2001
		F2	NO	SI	SI	51, 51, 49	
		F3	SI	SI	SI	55, 34, 52	
		F4	NO	SI	NO	34, 35	
		F5	NO	SI	SI	28	
Chipre	1	F4901A	ND	ND	ND	66, 54	Stavrou et al, 2002
		F4901B	ND	ND	ND	71, 49	
		F4903	ND	ND	ND	65, 53, 42	
		F4904	ND	ND	ND	65, 53, 45	
		F4905	ND	ND	ND	80, 62, 40	
		F4906	ND	ND	ND	70, 63	
Bélgica	1	F1B	SI	SI	NO	34, 38, 41, 41, 49, 43	Wolf MT et al, 2004
EEUU	1	F1A	SI	SI	SI	47M	Kiser R et al, 2004

Se han estudiado un total de 14 familias, con distintos orígenes (Tabla 3.3.2-2) con un total de 45 pacientes con ligamiento al locus 1 dializados o trasplantados. La edad media de supervivencia es de 46,5 años (Figura 3.3.2-3), mientras que la de nuestro grupo es de 39,37 años. Según los test estadísticos **LogRank Test** con $X^2=1,98831$ y

$p=0,158515$; **Wilcoxon Test** con $X^2=2,0083$ y $p=0,156434$, la diferencia entre ambos grupos no es estadísticamente significativa.



Una forma de facilitar el diagnóstico de la enfermedad sería detectar la existencia de una serie de rasgos fenotípicos que permitiesen establecer los mecanismos moleculares de la enfermedad, para lo que se necesitaría el establecimiento de la correlación fenotipo-genotipo.

La manifestación clínica más común de la enfermedad es la presencia de hiperuricemia, acompañada o no de artritis gotosa, y es independiente del locus al que ligue. Lo mismo sucede con los quistes renales medulares, que aunque la enfermedad se denomine quística medular éstos no están siempre presentes, por lo que tampoco nos sirve para el diagnóstico por lo que no se pueden definir unos parámetros concretos para establecer una correlación entre el genotipo y el fenotipo.

3.3.3. Elaboración del mapa físico ligado a la enfermedad en la región 1q21 y búsqueda de mutaciones en los genes candidatos

Se ha acotado la región candidata entre los marcadores *DIS305* y *DIS1653*, con un tamaño de aproximadamente unos 4 cM. Para la construcción del mapa físico de esta región se utilizaron los datos incluidos en la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), (*Anexo 1.1*).

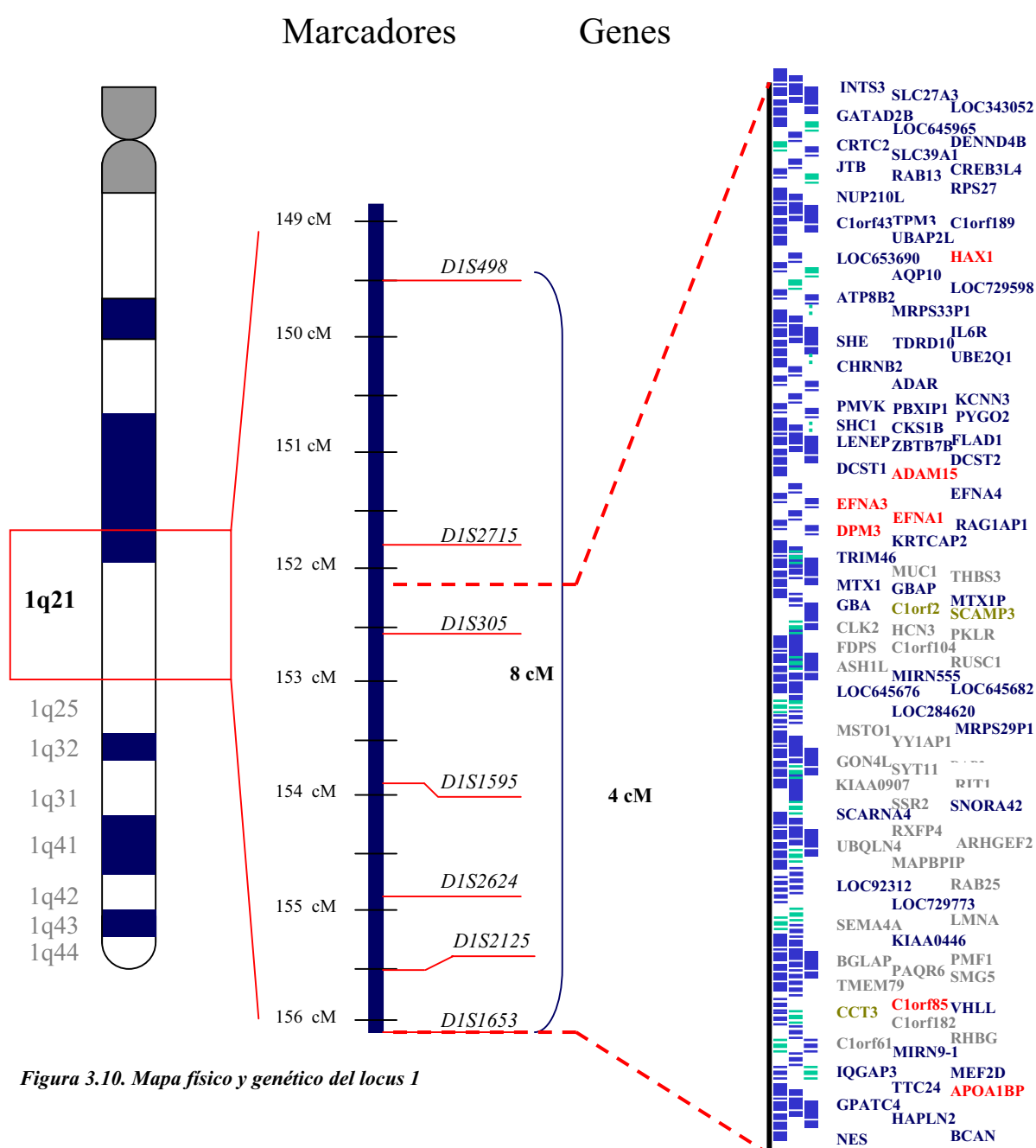


Figura 3.10. Mapa físico y genético del locus 1

Utilizando los datos extraídos de esta base de datos y ESTs se elaboró un mapa físico y genético integrado de la región (*Figura 3.10.*). Hasta el momento existen unos 90 genes descritos en la región, flanqueada por los marcadores microsatélite *DIS2715* y *DIS2125* (*Anexo 1.1*). En algunos de estos genes existe información sobre la proteína que codifican, su lugar de expresión e incluso, en ocasiones la función que tienen. Muchas de ellas han sido identificadas por ensayos in vitro, mientras que otras se han obtenido por alineamientos globales con otras proteínas ya conocidas tanto en el hombre como en otros organismos descritos (*C. elegans, Mus musculus, Rattus norvegicus...*)

Los criterios de selección de los genes candidatos se basan en:

1. todos los genes candidatos deben codificar proteínas con expresión renal, pudiendo expresarse también en otros tejidos
2. puesto que la inmunohistoquímica de individuos con ligamiento al locus 1 muestran un patrón de retención citoplasmático con una considerable reducción de uromodulina excretada, se han elegido genes cuyas proteínas puedan participar en la misma ruta de señalización de la uromodulina. Se han elegido así genes que pueden estar implicados en procesos de biosíntesis de la proteína, alteración de su transporte hacia la membrana apical o interacción a nivel de membrana que impida su corte normal con la consiguiente disminución de la excreción
3. fenotipo del animal modificado genéticamente (si existe).

Se han descartado hasta el momento más de 40 genes incluidos en esta región por secuenciación directa (algunos de ellos marcados en gris en la *Figura 3.10*)

Se han seleccionado según los criterios descritos, 6 genes localizados en esta región, con expresión renal, y con funciones descritas que podrían incluirse en la misma ruta que la uromodulina. Éstos son:

- ***ADAM15***: expresión renal y con función de proteólisis y adhesión célula-célula o célula matriz.

- ***EFNA3***: expresión renal y anclada a la membrana por un dominio GPI, propiedad compartida con la uromodulina.
- ***EFNA1***: expresión renal y anclada a la membrana por un dominio GPI, propiedad compartida con la uromodulina
- ***DPM3***: expresión renal e implicado en la biosíntesis de moléculas GPI.
- ***Clorf85***: expresión predominante en el riñón, con función desconocida.
- ***APOA1BP***: expresión en el túbulo contorneado proximal.

Existen 3 genes en la región acotada (*Figura 3.10.* en amarillo oscuro) que han sido estudiados previamente por otro grupo en los que se detectaron cambios nucleotídicos que no se pudieron descartar o confirmar como patogénicos puesto que no disponían de individuos suficientes para el estudio de cosegregación y tampoco estaba presente en ninguno de los 90 individuos sanos analizados.

Se ha hecho un estudio mutacional en nuestra cohorte de los 4 cambios concretos descritos en la literatura en los genes **AK000210**, **SCAMP3** y **CCT3** para buscar la presencia de estos cambios en nuestra cohorte.

3.3.4. Elaboración del mapa físico y genético de la región 1q41-43.

Se incluyeron en el estudio de ligamiento al *locus* 3 familias que además de presentar los criterios de inclusión explicados en apartados anteriores, disponían de un número de pacientes superior a tres y en más de una generación. Los marcadores microsatélite para el análisis de ligamiento a este *locus* son ***DIS3470***, ***DIS1660***, ***DIS1723***, ***DIS2668***, ***DIS245***, ***DIS425***, ***DIS217***, ***DIS419***, ***DIS2141*** y ***DIS1644*** distribuidos por la región 1q41 y 1q43 en este orden y con las posiciones que se detallan en la *Figura 3.11*. La región acotada por los marcadores es de aproximadamente 30 cM y 300 genes (*Anexo 1.2*), región en la que se han secuenciado 8 genes candidatos.

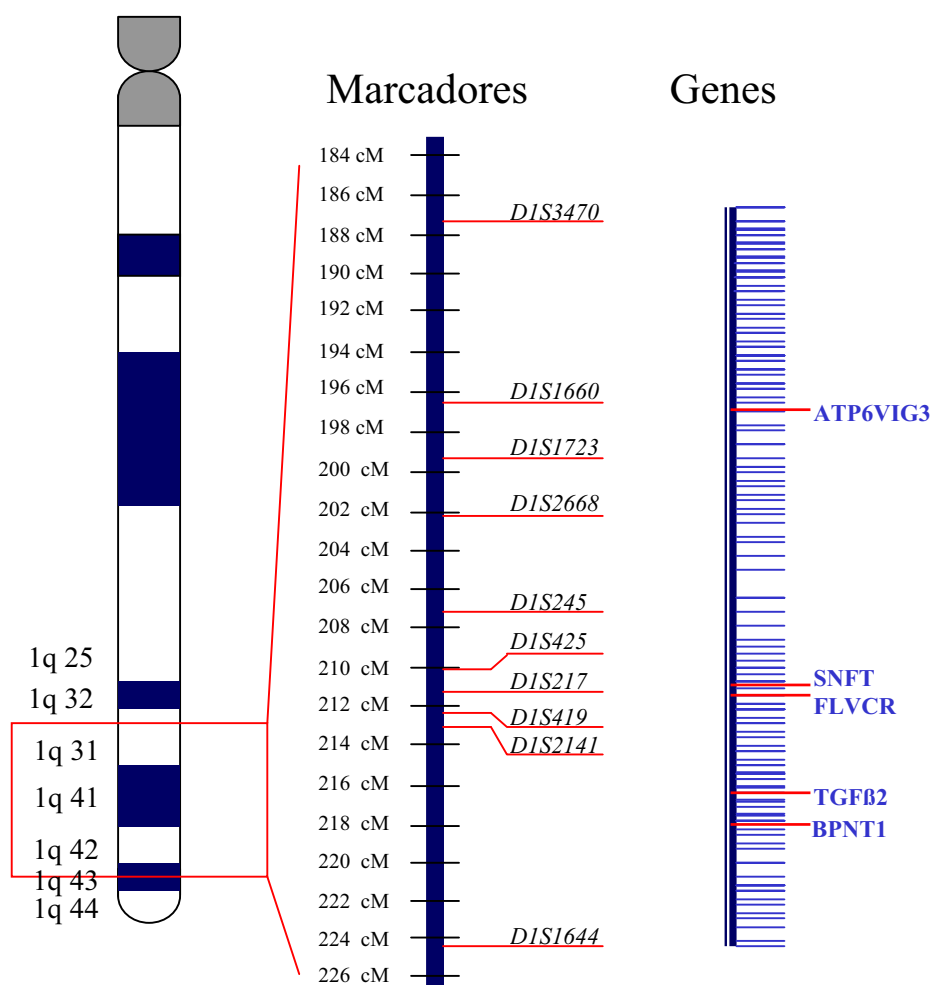


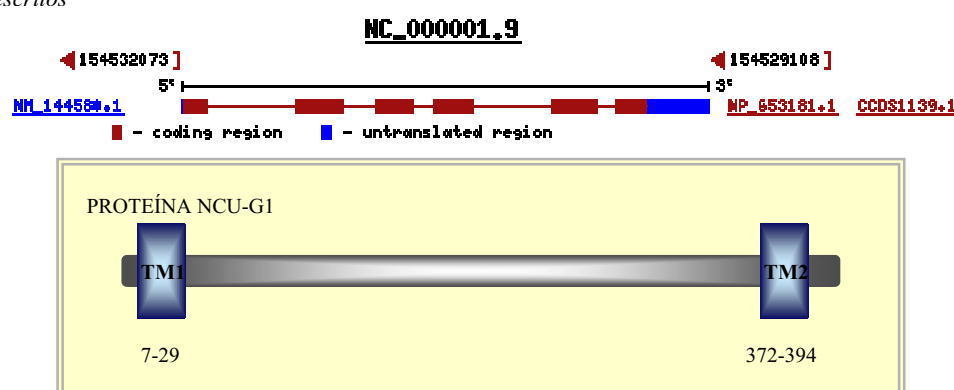
Figura 3.11. Mapa físico y genético de la región acotada, marcadores microsatélite utilizados, posición que ocupan en el cromosoma 1 y genes secuenciados hasta la fecha. Ninguno de ellos responsable de la enfermedad tipo 3.

3.3.5. Búsqueda de mutaciones de los genes candidatos.

3.3.5.1. Gen candidato NCU

Conocido también como *C1orf85* (*chromosome 1 open reading frame 85*) (*GeneID: 112770*). Gen localizado en la cadena *minus*, en la posición 1545529108. Constituido por 6 exones, una región 5'-UTR y 3'-UTR que abarcan en total 2965 pb (*Figura 3.3.4.1-1*). Codifica para una proteína conocida como **NCU-G1**, *proteína predominante del riñón*, motivo principal por el que fue seleccionado para secuenciar como candidato. Contiene dos dominios transmembrana, el primero entre los aminoácidos 7 y 29, y el segundo entre los aminoácidos 372 y 394.

Figura 3.12.1. Gen *C1orf85* y proteína NCU. Distribución de exones-intrones y regiones UTR. Producto de expresión proteína NCU predominante en riñón y con dos dominios transmembrana descritos



Tras la secuenciación de los 6 exones que lo constituyen junto con las regiones adyacentes de *splicing*, 3'-UTR y 5'-UTR se han encontrado una serie de cambios que han sido excluidos como patogénicos por tratarse de cambios silentes de elevada frecuencia en la población y cambios nucleotídicos en regiones intrónicas alejadas de los lugares de *splicing* identificados también en individuos sanos, por lo que se ha excluido al gen *C1orf85* como responsable de la enfermedad en nuestra cohorte.

3.3.5.2. Gen candidato APOA1-BP

Conocido como *APOA1BP* *apolipoprotein A-I binding protein* (Gene ID: 128240). Se trata de un gen localizado en la posición 154828182 de 2533 pb (Figura 3.3.4.3-1). Se trata de un gen distribuido en 6 exones con una región promotora que no contiene *TATA box* pero rica GC, con aparentes lugares de unión a factores de transcripción comunes entre genes implicados en el metabolismo de lípidos ⁽⁹⁰⁾. El producto de expresión de estos genes interacciona con la apolipoproteína A1 (apoA-I), la apolipoproteína más grande de las lipoproteínas *HDL*.

Figura 3.12.2. Gen *APOA1-BP*. Distribución de exones-intrones y regiones UTR del gen.



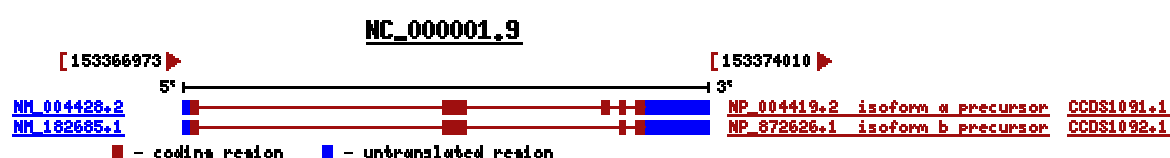
La proteína madura tiene 288 aminoácidos, contiene un péptido señal en la región N-terminal, un sitio de corte y diversos lugares de fosforilación y glicosilación. El riñón es el tejido de mayor expresión de la proteína, aunque se encuentra también en otros tejidos tales como hígado, corazón, glándula tiroidea y adrenal y testículos. Se ha detectado también en fluidos biológicos como líquido cerebro-espinal y orina. A nivel renal, la localización principal es en el túbulo contorneado proximal ⁽⁹⁰⁾. La estimulación de células derivadas de esta región con *apoA-1* o *HDL* induce la secreción de *apoA-1BP* indicando un importante papel de la proteína en la degradación y reabsorción tubular de la *apoA1*.

El hecho de que la proteína esté localizada en la región acotada del locus 1 junto con su patrón de expresión y localización tubular nos hizo proponer este gen como candidato. Tras la secuenciación directa de los 6 exones junto con la región promotora y UTRs se pudo detectar una serie de cambios nucleotídicos que no cosegregaban con la enfermedad por lo que se excluyó como gen responsable de la enfermedad.

3.3.4.3. Gen candidato EFNA1

El gen EFNA1 se encuentra en la región candidata del locus 1, en la posición 153366973 y contiene 7 Kb ⁽⁹¹⁾. Presenta dos transcritos distintos, el primero de ellos constituido por 5 exones, isoforma a (*Fig 3.12.3*), forma más larga y una segunda variante que usa un splicing alternativo distinto al de la isoforma a. La isoforma b resultante presenta el mismo N- y C-terminal pero es más corta que la anterior puesto que carece del tercer exón.

Figura 3.12.3. Gen EFNA1. Distribución de exones-intrones y regiones UTR del gen y de los dos transcritos



Este gen codifica una proteína miembro de la familia de las efrinas, que incluyen receptores tirosin-kinasas mediadores del desarrollo especialmente en el sistema nervioso y en la eritropoyesis. Esta familia de efrinas ha sido, a su vez, dividida en dos clases distintas, EFNA (Efrinas A) y EFNB (Efrinas B) en función de la homología de su dominio extracelular ⁽⁹²⁾. Las EFNAs se caracterizan por ser proteínas de membrana ancladas a ésta por un dominio GPI, mientras que las EFNBs son ancladas a la membrana mediante dominios transmembrana. Este gen codifica para una EFNA de unión a receptores EPHA2, EPHA4, EPHA5, EPHA6 y EPHA7. El riñón, en su desarrollo precisa de diversas rutas de señalización mediadas por receptores tirosin-kinasa, por ejemplo para la coordinación de la migración celular, proliferación, diferenciación y morfogénesis ⁽⁹³⁾.

La proteína codificada por EFNA1 es de pequeño tamaño, lleva una molécula GPI anclada en su C-terminal y un péptido señal de 18 aminoácidos (1-18). La forma más larga posee 205 aminoácidos y se expresa principalmente en cerebro, colon, corazón, riñón, hígado y pulmón.

El motivo por el que se eligió este gen como candidato, además de estar en la región acotada y con expresión renal, fue básicamente por codificar una proteína de la misma familia que la uromodulina, con un GPI de anclaje a la membrana. El hecho de

que se tratase de una proteína relacionada directamente con receptores tirosin-kinasa implicados en la organogénesis renal estimuló bastante la elección, por lo que se realizó una búsqueda completa de mutaciones en todo el gen excluyendo simplemente las regiones intrónicas.

En el análisis de secuencia se identificó un único cambio que afectaba a la región codificada **D159V**, presente en 6 individuos, se trata de una cambio *missense* no conservativo según la matriz *Blossum62*. El hecho de que se detectase en dos individuos sanos utilizados como control lo hizo descartar como patogénico. También se identificaron una serie de cambios en la región promotora y en el intrón 1, cuya elevada frecuencia, incluso en sanos hizo descartar como patogénicos, por lo que se descartó este gen como candidato de la enfermedad.

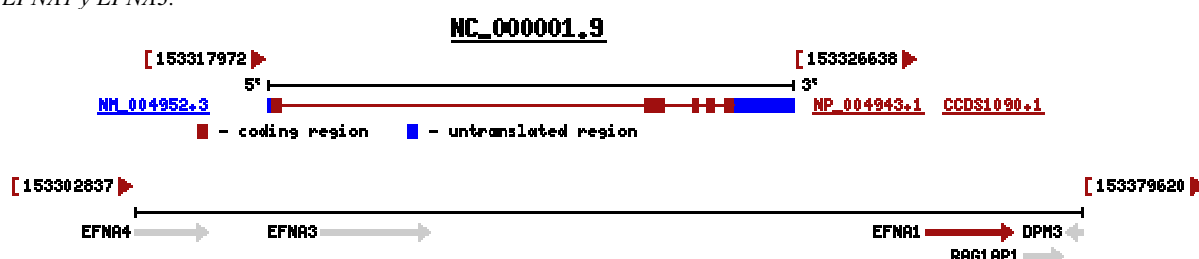
Tabla 3.11.1. Relación de los cambios detectados en la secuenciación del gen EFNA1. C= cambio conservativo, NC= cambio aminoacídico no conservativo, S= cambio silente.

Región	Posición	Cambio	Aminoácido	Tipo de Cambio	Frecuencia
PROMOTOR	g.153360890	A>G	-	-	24/40
	g.153360477	G>A	-	-	10/40
INTRON 1	g.3450	IVS1-18DelCT	-	-	1/40
EXON 4	g.5879, c.476	A>T	D159V	NC	6/40

3.3.5.4. Gen candidato EFNA3

El gen *EFNA3* se encuentra en la región candidata del locus 1, en la posición 153317972, contiene 8,6 Kb, y se encuentra adyacente al gen *EFNA1* (Fig 3.12.4.)⁽⁹¹⁾ y, al igual que él contiene 5 exones. Codifica una proteína llamada efrina 3 de 238 aminoácidos que junto con la efrina 1 interacciona con el receptor *EPHA1* tirosin-kinasa, complejo activado principalmente durante el desarrollo embrionario del ratón⁽⁹⁴⁾ en el que se incluye la organogénesis.

Figura 3.12.4. Gen *EFNA3*. Distribución de intrones- exones y regiones UTR del gen. Ubicación cromosómica de *EFNA1* y *EFNA3*.



Los motivos por los que este gen se ha seleccionado como candidato son los mismos que los expuestos para *EFNA1*, además de estar en la región acotada y con expresión renal, se trata de una proteína con un GPI de anclaje a la membrana que junto con la efrina 1 provoca la activación de receptores tirosin-kinasa implicados en organogénesis.

Tabla 3.11.2. Relación de los cambios detectados en la secuenciación del gen *EFNA3*. C= cambio conservativo, NC= cambio aminoácido no conservativo, S= cambio silente.

Región	Posición	Cambio	Aminoácido	Tipo de Cambio	Frecuencia
EXON 2	g.6302 c.282	GGtgggccccggggCGG	Del12bp	IN FRAME	3/46
EXON 4	g.7316 c.638	GTG>aTG	V190M	CONSERVATIVO	13/46
3'-UTR	g.7697 c.812	GGAgGAGA	InsG	-	11/46
3'-UTR	g.8504 c.1619	A>g	-	-	14/46

Los cambios detectados tras el análisis de la secuencia nucleotídica se encuentran resumidos en la *Tabla 3.11.2*.

Ninguno de los cambios detectados en el gen EFNA3 se han considerado como patogénicos, puesto que existen individuos sanos que también lo tienen. El cambio *in frame* descrito en la *Tabla 3.11.2* afecta al exón 2, no interrumpe la pauta de lectura normal, simplemente acorta la proteína, pues carece de 4 aminoácidos con respecto a la proteína normal. El hecho de que se encontrase también en uno de los individuos control nos hizo descartarla como patogénica en MCKD, pero se visto que está presente también en homocigosis en una de las familias de nefropatía intersticial con herencia recesiva. El individuo en el que se ha detectado el cambio presenta, además de fenotipo renal, hepatomegalia y retraso mental.

No existen evidencias de antecedentes en la familia, por eso es compatible con herencia recesiva. La delección elimina 4 aminoácidos distintos, Valina, Glicina, Prolina y Glicina (**VGPG**) que ocupan la posición 71 a 74.

Para poder descartar los cambios detectados como patogénicos se debe conocer en primer lugar si el cambio afecta a un residuo altamente conservado evolutivamente, siendo así significativo y si además afectan a regiones funcionales de la proteína que puedan alterar su actividad normal.

Conservación aminoacídica de la proteína Efrina 3.

La patogenicidad de una mutación *in frame* no es siempre del todo clara. Existen diversos estudios en los que se recurre a la conservación de la proteína para determinar si un cambio aminoacídico puede estar implicado en la patogénesis en función de su conservación evolutiva ^(95, 96). Al comparar la secuencia de la efrina 3 en distintos organismos (*Macaca mulata*, *Mus musculus*, *Danio rerio*), se observa una gran conservación a lo largo de la evolución (la efrina 3 de *Rattus norvegicus* es mucho menos conservada), concretamente los residuos delecionados VGPG, incluidos dentro del dominio efrina, están presentes además de en el hombre en el macaco rhesus, muy próximo evolutivamente.

Figura 3.12.5. Conservación proteica evolutiva de la proteína metargidina. En rojo aparecen los aminoácidos en los que se ha detectado un cambio. En gris aparecen las regiones más conservadas de la proteína.

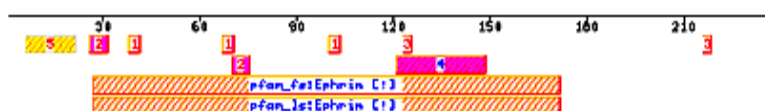
Homo-sapiens	MAAAPLLLLLLLLVPVPLLPLLAQGGPGALGNRHAVYWNSSNQHLRREGYTVQVNVNDYLD
Macaca-mulatta	MAAAPLLLLLLLLVPVPLLPLLAQGGPGALGNRHAVYWNSSNQHLRREGYTVQVNVNDYLD
Mus-musculus	MAAAPLLLLLLLLVPVPLLPLLAQGGPGALGNRHAVYWNSSNQHLRREGYTVQVNVNDYLD
Danio-rerio	MALYALCLFLLTLCTNFALVT-----AARHAVHWNSSNILLRKEGYTLQVNVNDYLD
	** . * * : ** : . . : . : * : : . * * * : * * * * * * * : * * * * * * * * * * * *
Homo-sapiens	IYCPHYNSSGVGPGAGPGPGGGAEQYVLYMVSRNGYRTCNASQGFKRWEENRPHAPHSPI
Macaca-mulatta	IYCPHYNSSGVGPGAGPGPGGGAEQYVLYMVSRNGYRTCNASQGFKRWEENRPHAPHSPI
Mus-musculus	IYCPHYNSS-----GPGGGAEQYVLYMVNLSGYRTCNASQGSKRWEENRQHASHSPI
Danio-rerio	IYCPHYNSS-----QRGIAEQYVLYMVSYRGYRTCDPQLGFKRWEENRPHAPHAPI
	***** *
Homo-sapiens	KFSEKFQRYSAFSLGYEFHAGHEYYYISTPTHNLHWKCLRMKVFCVCCASTSHSGEKPVPPT
Macaca-mulatta	KFSEKFQRYSAFSLGYEFHAGHEYYYISTPTHNLHWKCLRMKVFCVCCASTSHSGEKPVPPT
Mus-musculus	KFSEKFQRYSAFSLGYEFHAGHEYYYISTPTHNLHWKCLRMKVFCVCCASTSHSGEKPVPPT
Danio-rerio	KFSEKFQRYSAFSLGYEFHAGHEYYYISTPTHNLHWKCLRMKVFCVCCASTSHSGEKPVPPT
	***** *
Homo-sapiens	LPQFTMGPNVKINVLEDFEGENPQVPKLEKSISGTSPKREHLPLAVGIAFFLMTFLAS
Macaca-mulatta	LPQFTMGPNVKINVLEDFEGENPQVPKLEKSISGTSPKREHLPLAVGIAFFLMTFLAS
Mus-musculus	LPQFTMGPNVKINVLEDFEGENPQVPKLEKSISGTSPKREHLPLAVGIAFFLMTLLAS
Danio-rerio	EPDYTLRPNIKIDDLDD--YDNPEVPKLEKSISGSSPKREHLPLTVAS-LLLIALLSVS
	* : : *

El residuo V en la posición 190 está bastante conservado evolutivamente, por lo que podría considerarse patogénico desde el punto de vista evolutivo.

Predicción de los dominios proteicos de la Efrina 3.

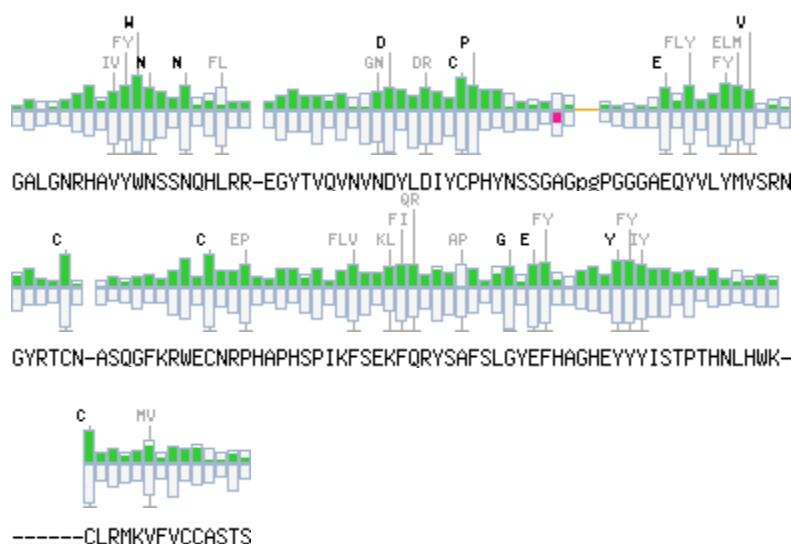
Para poder determinar la patogenicidad de este cambio, se necesita conocer en primer lugar si los residuos aminoacídicos ocupan una posición relevante para la funcionalidad proteica, por lo que se ha hecho un estudio predictivo de dominios funcionales mediante el alineamiento local de la efrina con todas aquellas proteínas con dominios proteicos caracterizados y conocidos. Se usó para ello la base de datos *motifScan* ⁽⁹⁷⁾ obteniéndose un único dominio conocido, el dominio efrina que caracteriza a la familia, entre los aminoácidos 21 y 171.

Figura 3.12.6. Representación gráfica de la proteína efrina 3. dominios presentes en su estructura primaria según alineamientos locales obtenidos por el programa predictor de dominios Prosite



1	38	41	freq_pat:ASN_GLYCOSYLATION
1	67	70	freq_pat:ASN_GLYCOSYLATION
1	100	103	freq_pat:ASN_GLYCOSYLATION
2	26	31	freq_pat:MYRISTYL
2	70	75	freq_pat:MYRISTYL
3	123	125	freq_pat:PKC_PHOSPHO_SITE
3	216	218	freq_pat:PKC_PHOSPHO_SITE
5	6	21	prf:LEU_RICH
Ephrin	27	171	pfam_fs:Ephrin

Figura 3.12.7. Dominio Efrina, descrito entre los aminoácidos 27 y 171.

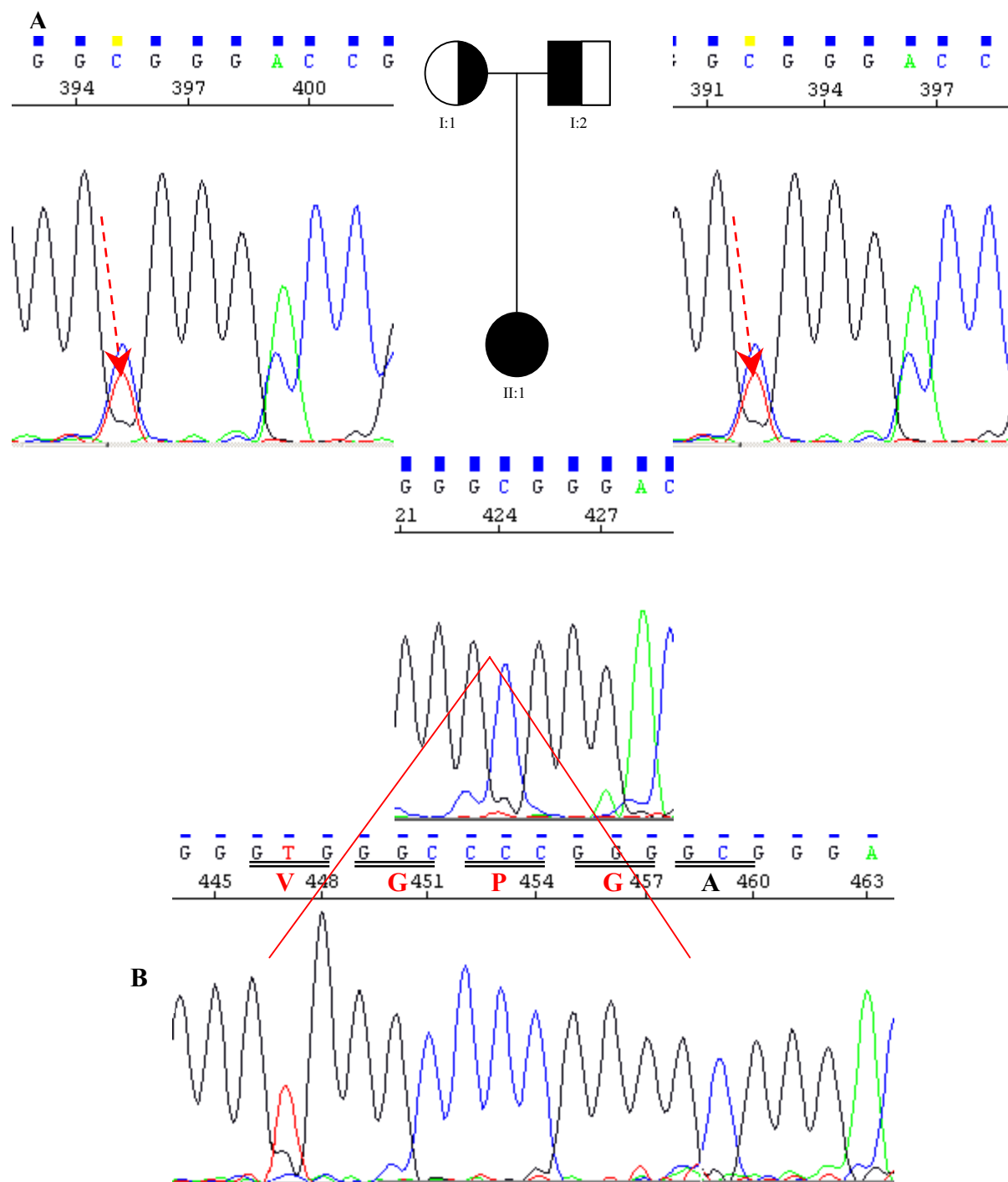


Se han identificado también motivos funcionales importantes en la conformación de la proteína, existen tres asparraginas (N) susceptibles de glicosilación entre los aminoácidos 38-41, 67-70 y 100-103, dos 2 lugares de miristilación, dos lugares de fosforilación por proteínas kinasa tipo C y un lugar rico en aminoácidos leucina (L).

El cambio V190M, no afecta a ningún dominio proteico, por lo que su alteración no debería alterar la función de la proteína. De todas formas es necesario un estudio de cosegregación para confirmar su patogenicidad. Los aminoácidos VGPG están incluidos en el dominio efrina descrito, por lo que podría verse alterada la función normal de la proteína, principalmente en el individuo homocigoto.

Estudio de cosegregación del cambio 6302-6313DelTGGGCCCCGGGG

Figura 3.12.8. Deleción “in frame” DelTGGGCCCCGGGG. A. Estudio de cosegregación del cambio en la familia con nefropatía intersticial asociada a retraso mental y hepatomegalia, con padres heterocigotos para la enfermedad y afecta con la deleción en homocigosis. B. Electroferograma normal donde se aprecian las bases delecionadas.

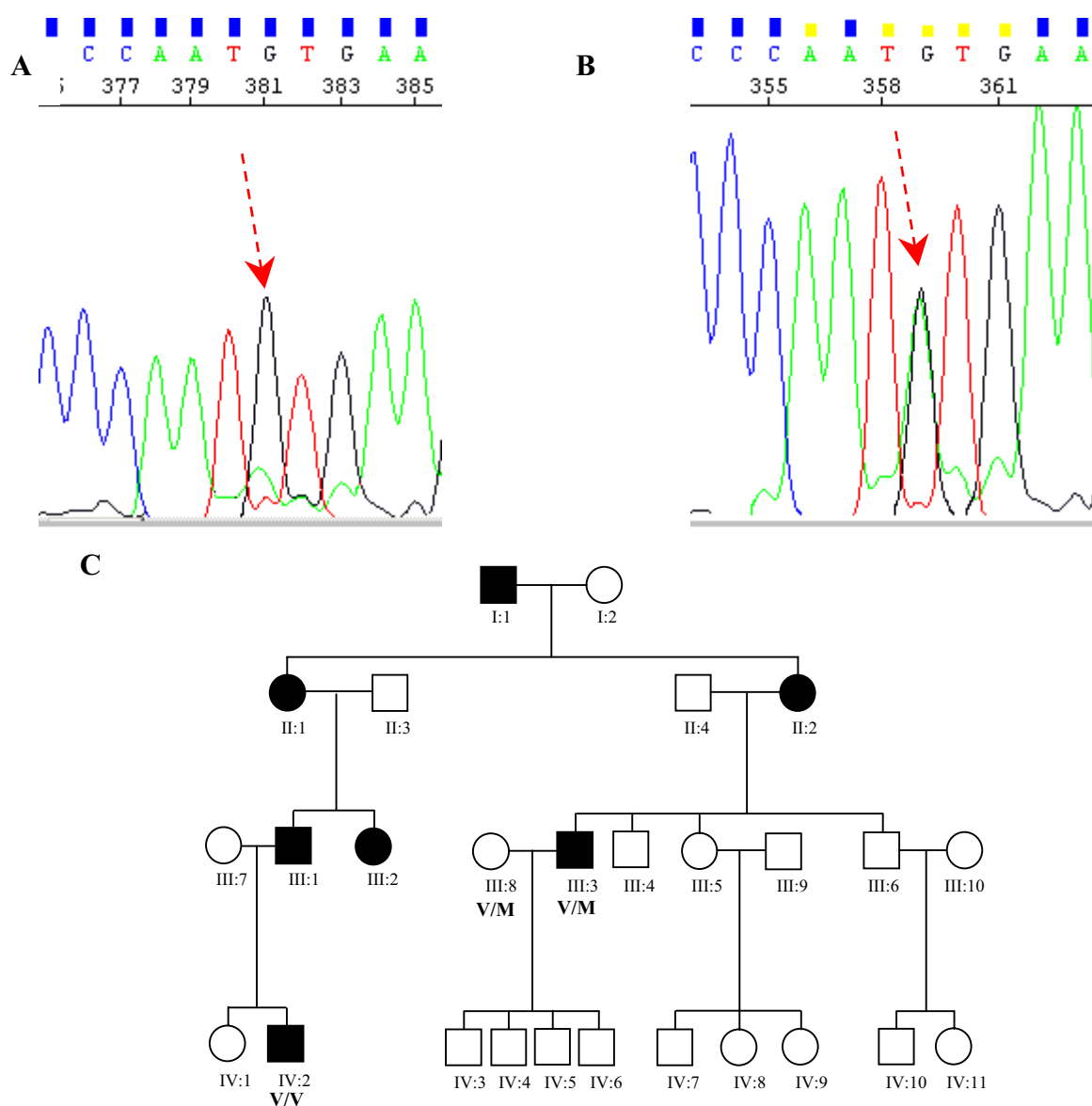


Se ha hecho también estudio de cosegregación del cambio **282-293Del(12pb)** deleción “in frame” detectada por secuenciación directa en una familia diagnosticada con nefropatía intersticial con retraso mental y hepatomegalia, donde los padres son portadores heterocigotos para la enfermedad y el individuo porta ambos alelos mutados (Figura 2.12.8.).

Estudio de cosegregación del cambio V190M.

Se ha hecho también estudio de cosegregación del cambio conservativo V190M, que tal y como se puede ver en la Figura 3.12.9, no existe cosegregación, puesto que también está presente en el cónyuge III.8 y el individuo IV.2 no lo tiene.

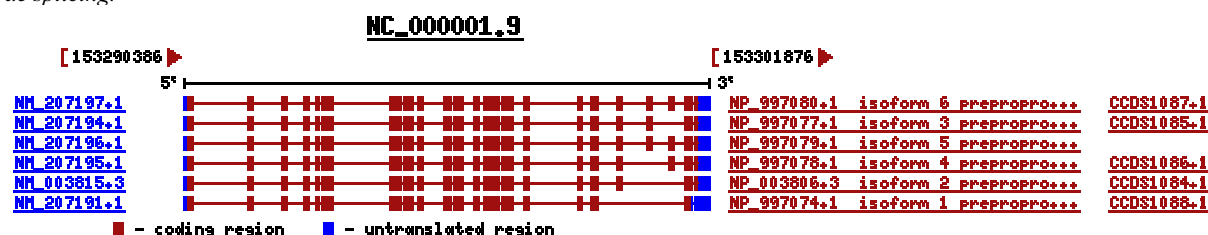
Figura 3.12.9. Cambio V190M (GTG>ATG). A. Electroferograma normal, B. Electroferograma con cambio G>A. C. Cosegregación familiar en la familia MCKD11



3.3.5.6. Gen candidato ADAM15

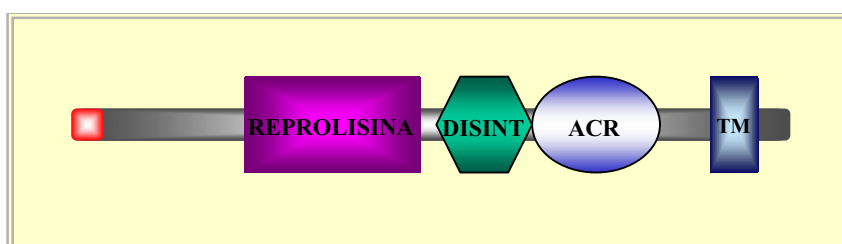
El gen ADAM15, conocido también como MDC15, se encuentra en la posición 153290386, está constituido por 11,5 Kb en los que se localizan 22 exones en la variante más larga. Presenta seis transcritos distintos por *splicing* alternativo que codifican para 6 proteínas distintas con un tamaño que va desde 863 aminoácidos para la proteína más larga hasta 772 para la más corta.

Figura 3.12.10. Gen ADAM15. Distribución de intrones- exones y regiones UTR del gen, y de las distintas variantes de *splicing*.



Este gen codifica para una proteína perteneciente a la familia ADAM (*α disintegrin and metalloproteinase*) familia en la que se incluyen proteínas como disintegrinas y metaloproteasas. Se caracterizan por ser glicoproteínas transmembrana tipo I implicadas en adhesión celular y proteólisis de citoquinas y moléculas de adhesión. El producto de expresión de ADAM15 es la metargidina, proteína que contiene los siguientes dominios y motivos funcionales (Fig 3.12.11.):

Figura 3.12.11. Proteína metargidina. Dominios proteicos descritos en la proteína.



- **Dominio Reprolisina:** entre los aminoácidos 213 – 414,
- **Dominio Disintegrina:** entre los aminoácidos 430-506, mediante este dominio la metargidina interacciona específicamente con la cadena β3 de la integrina

- **Dominio ACR:** entre los aminoácidos 507-649,
- **Dominio TM:** entre los aminoácidos 695-717,
- **Motivo RGD:** entre los aminoácidos 484-487,

Los motivos por los que este gen se ha seleccionado como candidato son además de expresión renal y localizarse en la región candidata el tener función de adhesión celular célula-célula y célula matriz.

Los cambios detectados tras el análisis de la secuencia nucleotídica se encuentran resumidos en la *Tabla 3.11.3*.

Tabla 3.11.3. Relación de los cambios detectados en la secuenciación del gen ADAM15. C= cambio conservativo, NC= cambio aminoacídico no conservativo, S= cambio silente.

<i>Región</i>	<i>Aminoácido</i>	<i>Tipo de Cambio</i>	<i>Frecuencia</i>
Exón 14	P541P	Silente	1/46
Exón 14	T549T	Silente	27/46
Exón 17	W679X	Nonsense	1/46
Exón 19	P749P	Silente	1/46
Exón 19	K759k	Silente	14/46
IVS19	IVS19+9 T>C	Splicing Site	31/46
IVS19	IVS19+26 G>A	Splicing site	13/46
Exón 20	P769S	Missense	15/46

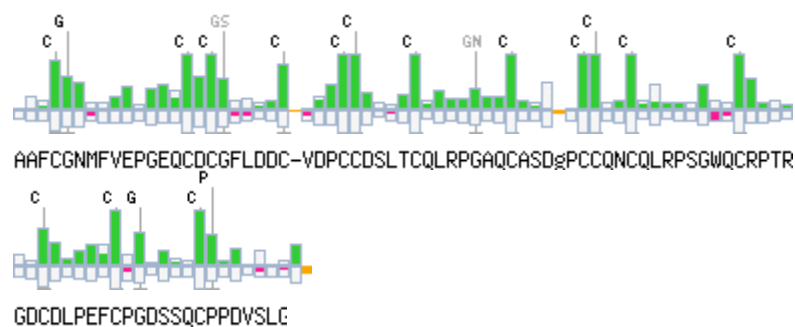
Conservación Proteica.

Mediante el alineamiento de la secuencia aminoacídica de la proteína en diferentes organismos se puede predecir si el cambio puede ser patogénico o no, y se debe en gran medida a la conservación aminoacídica a lo largo de la evolución. Evaluamos así los cambios ocurridos en los aminoácidos **K191**, **N563** y **P769** y comprobamos que K191 es exclusivo del hombre y que es compartido entre *Bos taurus*, *Mus musculus* y *Rattus norvegicus*. La asparragina está conservada en el hombre, toro y chimpancé mientras que en rata y ratón poseen serina y finalmente la prolina de la posición 769 está conservada en hombre, ratón y toro.

Figura 3.12.12. Conservación proteica evolutiva de la proteína metargidina. En rojo aparecen los aminoácidos en los que se ha detectado un cambio. En gris aparecen las regiones más conservadas de la proteína.

<i>Homo sapiens</i>	MRLALLWALGLLGAGSPLPSWPLPNIG-----GTEEQQ
<i>Pan troglodytes</i>	MRLALLWALGLLGAGSPLPSWPLPNIALLSIPSVLSWGVLPAGGTTEEQQ
<i>Bos taurus</i>	MRLALLWALGLLGAGSPLPSRPLPDIG-----VTEEMQ
<i>Mus musculus</i>	MRLALLWALGLLGAGSPRPSPLPNIG-----GTEEQQ
<i>Rattus norvegicus</i>	MRLALLWALGLLGAGSPRPSPLPNIG-----GTEEQQ
***** ** **:	
<i>Homo sapiens</i>	AESEKAPREPLEPQVLQDDLPISLKKVLQTSLEPELRIKLELDGDSHILE
<i>Pan troglodytes</i>	AESEKAPREPLEPQVLQDDLPISLKKVLQTSLEPELRIKLELDGDSHILE
<i>Bos taurus</i>	ARPERAQNGLPEPQILQDNPTLSLAEALQTSLEPEALRIKLELDGESHILE
<i>Mus musculus</i>	ASPERTLSGSMESRVVHDSPPMSLADVLQTLPEALRISLELDSHILE
<i>Rattus norvegicus</i>	ASPERTQSRSLNQVVDSPPINLTETVLQTLPELRIKLELDGDSHILE
* .*: .: *::: * .: * .: * .: * .: * .: * .: * .: * .: * .: *	
<i>Homo sapiens</i>	LLQNRELVPGRPTLVWYQPDGTRVSEGHLENCCYQGRVRYAGSWVSI
<i>Pan troglodytes</i>	LLQNRELVPGRPTLVWYQPDGTRVSEGHLENCCYQGRVRYAGSWVSI
<i>Bos taurus</i>	LLQNRELVSGRPTLVWYQPDGTRVSEGHLENCCYEGRVRYAGSWVSI
<i>Mus musculus</i>	LLQNRDLIPGRPTLVWYQPDGTRVSEGHLENCCYGRVRYAGSWVSI
<i>Rattus norvegicus</i>	LLQNRDLIPGRPTLVWYQPDGTRVSEGHLENCCYGRVRYAGSWVSI
* ***: * .: * .: * .: * .: * .: * .: * .: * .: *	
<i>Homo sapiens</i>	CTCSGLRGLVVLTPERSYTLQPGDLQGPPIISRIQDLHLPGLTCALSW
<i>Pan troglodytes</i>	CTCSGLRGLVVLTPERSYTLQPGDLQGPPIISRIQDLHLPGLTCALSW
<i>Bos taurus</i>	CTCSGLRGLVILSPERSYVSELGPRDLQGPVVSRIQDLHLPGLTCALSW
<i>Mus musculus</i>	CACSGIRGLIVLSPERSYTLQPGDLQGPVVSRIQDLHLPGLTCALSW
<i>Rattus norvegicus</i>	CACSGIRGLIVLSPERSYTLQPGDLQGPVVSRIQDLHLPGLTCALSW
* ***: * .: * .: * .: * .: * .: * .: * .: * .: *	
<i>Homo sapiens</i>	RESVHTQKPEEHLGQRHRR-RRDVVTETKTVELVIVADHSEAQKYRDF
<i>Pan troglodytes</i>	RESVHTQPEEHLGQRHRR-RRDVVTETKTVELVIVADHSEAQKYRDF
<i>Bos taurus</i>	PTSVLPQALPEPSLQGRHTRWRDVTETKIVELVIVADHAEVKRHRDF
<i>Mus musculus</i>	HASVPTRAEDDLLEQHHAHRLKRDVVTETKIVELVIVADNSEVRKYPDF
<i>Rattus norvegicus</i>	HAFVPTREAPDLLEQHHLRRLKRDVVTETKIVELVIVADNSEVRKYPDF
* .: * .: * .: * .: * .: * .: * .: * .: *	
<i>Homo sapiens</i>	QHLNRTLEVALLDLTFEFLNVRVALVGLAWTQRDLEISPNPAVTLE
<i>Pan troglodytes</i>	QHLNRTLEVALLDLTFEFLNVRVALVGLAWTQRDLEISPNPAVTLE
<i>Bos taurus</i>	QSLNRTLEVALLDLTFEFLNVRVALVGLAWTQHNLIHISQNPGLTLD
<i>Mus musculus</i>	QQLNRTLEVALLDLTFEFLNVRVALVGLAWTQHNLIHISQNPGLTLD
<i>Rattus norvegicus</i>	QQLNRTLEVALLDLTFEFLNVRVALVGLAWTQRDLEISPNPAVTLE
* ***: * .: * .: * .: * .: * .: * .: * .: * .: *	
<i>Homo sapiens</i>	NFLHWRRAHLLPRLPHDSAQLVTGTSFSGPTVGMAIQNSICSPDFSGGVN
<i>Pan troglodytes</i>	NFLHWRRAHLLPRLPHDSAQLVTGTSFSGPTVGMAIQNSICSPDFSGGVN
<i>Bos taurus</i>	SFLHWRRTNLLPRLPHDSAQLVTGTSFSGPTVGMAIQNSICSPDFSGGVN
<i>Mus musculus</i>	NFLRWRTDLLPRLPHDSAQLVTGTSFSGPTVGMAIQNSICSPDFSGGVN
<i>Rattus norvegicus</i>	NFLRWRTDLLPRLPHDSAQLVTGTSFSGPTVGMAIQNSICSPDFSGGVN
* ***: * .: * .: * .: * .: * .: * .: * .: * .: *	
<i>Homo sapiens</i>	MDHSTILGVASSIAHELGHSLGLDHDLPGNSCPCPGPAPAKTCIMEAST
<i>Pan troglodytes</i>	MDHSTILGVASSIAHELGHSLGLDHDLPGNSCPCPGPAPAKTCIMEAST
<i>Bos taurus</i>	MDHSTILGVASSIAHELGHSLGLDHDLPGNSCPCPGPAPAKSCIMEAST
<i>Mus musculus</i>	MDHSTILGVASSIAHELGHSLGLDHDLPGNSCPCPGPAPAKSCIMEAST
<i>Rattus norvegicus</i>	MDHSTILGVASSIAHELGHSLGLDHDLPGNSCPCPGPAPAKSCIMEAST
* ***: * .: * .: * .: * .: * .: * .: * .: * .: *	
<i>Homo sapiens</i>	DFLPGLNFSNCSRALEKALLDGMGSCFLERLPSLPMAAFSGNMVFEPG
<i>Pan troglodytes</i>	DFLPGLNFSNCSRALEKALLDGMGSCFLERLPSLPMAAFSGNMVFEPG
<i>Bos taurus</i>	DFLPGLNFSNCSRALEKALLDGMGSCFLERLPSLPMAAFSGNMVFEPG
<i>Mus musculus</i>	DFLPGLNFSNCSRALEKALLDGMGSCFLERLPSLPMAAFSGNMVFEPG
<i>Rattus norvegicus</i>	DFLPGLNFSNCSRALEKALLDGMGSCFLERLPSLPMAAFSGNMVFEPG
* ***: * .: * .: * .: * .: * .: * .: * .: * .: *	
<i>Homo sapiens</i>	EQCDCGFLLDDCVDPCDLSLTCQLRPGAQACASDGPCQNCQLRPSGWQCRP
<i>Pan troglodytes</i>	EQCDCGFLLDDCVDPCDLSLTCQLRPGAQACASDGPCQNCQLRPSGWQCRP
<i>Bos taurus</i>	EQCDCGFLLDDCVDPCDLSLTCQLRPGAQACASDGPCQNCQLRPSGWQCRP
<i>Mus musculus</i>	EQCDCGFLLDDCVDPCDLSLTCQLRPGAQACASDGPCQNCQLRPSGWQCRP
<i>Rattus norvegicus</i>	EQCDCGFLLDDCVDPCDLSLTCQLRPGAQACASDGPCQNCQLRPSGWQCRP
* ***: * .: * .: * .: * .: * .: * .: * .: * .: *	
<i>Homo sapiens</i>	TRGDCDLPEFCPGDSSQCPDVSIGDGEPCAGGQAVCMHGRCASYAQCCQ
<i>Pan troglodytes</i>	TRGDCDLPEFCPGDSSQCPDVSIGDGEPCAGGQAVCMHGRCASYAQCCQ
<i>Bos taurus</i>	TRGDCDLPEFCPGDSSQCPDVSIGDGEPCAGGQAVCMHGRCASYAQCCQ
<i>Mus musculus</i>	PTDDCDLPEFCPGDSSQCPDVSIGDGEPCAGGQAVCMHGRCASYAQCCQ
<i>Rattus norvegicus</i>	PTDDCDLPEFCPGDSSQCPDVSIGDGEPCAGGQAVCMHGRCASYAQCCQ
* ***: * .: * .: * .: * .: * .: * .: * .: * .: *	
<i>Homo sapiens</i>	SLWGPAGQPAAPLCLQTANTRGNAFGSCGRNPSGSYVSCTPRDAICGQLQ
<i>Pan troglodytes</i>	SLWGPAGQPAAPLCLQTANTRGNAFGSCGRNPSGSYVSCTPRDAICGQLQ
<i>Bos taurus</i>	ALWGPAGQPAAPLCLQTANTRGNAFGSCGRNPSGSYVSCTPRDAICGQLQ

Domino DISINTEGRIN_2
entre los residuos
aminoácidos 421 y 508



Domino o región rica en
prolina (PRO_RICH) entre los
aminoácidos 767 y 856



- un dominio EGF tipo 2 entre los aminoácidos 673 y 684
- un dominio de unión al zinc entre los aminoácidos 345 y 354
- un dominio reprotisina-metaloproteasa entre los aminoácidos 213 y 414 ya descrito como característico de la familia.
- una región rica en residuos cisteína entre los aminoácidos 508 y 629
- un dominio disintegrina entre los residuos 421 y 508, que prácticamente ocupa la misma posición que el descrito en la literatura
- y una región rica en residuos prolina entre los aminoácidos 767 y 856.

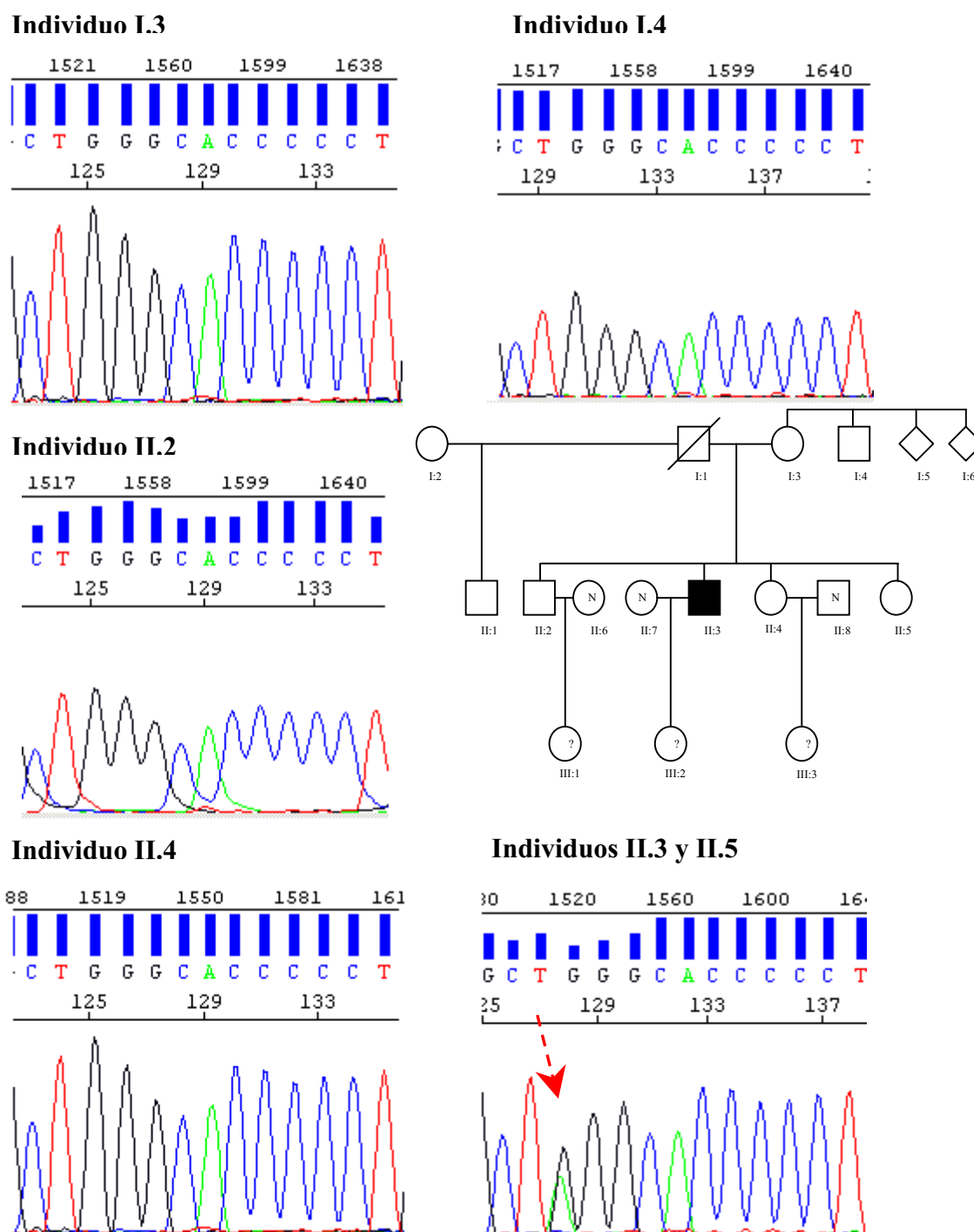
El cambio K191 no afecta a ningún dominio funcional, lo que explica que pese a su elevada frecuencia, incluso en homocigosis no provoque ningún efecto, mientras que el aminoácido P769 se encuentra en un dominio rico en prolina. El aminoácido N de la posición 563 se encuentra en un dominio rico en cisteínas, por lo que su cambio no tendría porqué afectar a la funcionalidad proteica, aunque sí podría impedir la glicosilación normal de la proteína.

El cambio *nonsense* **W679X** interrumpe la pauta de lectura de la proteína, eliminando de su secuencia cerca de 200 aminoácidos, aparentemente interrumpe la formación de los puentes disulfuro entre los residuos cisteína del dominio *EGF*, impidiendo así un plegamiento correcto de la proteína que impediría, por ejemplo un transporte correcto como sucede con la uromodulina. Existe también un dominio transmembrana entre los aminoácidos **695** y **717** que ancla a la proteína a la membrana apical, la proteína al carecer

de esta región pierde la posibilidad de unirse a la membrana, por lo que su función normal queda alterada.

Estudio de cosegregación del cambio W679X

Figura 3.12.14. Cambio W679X. Cosegregación familiar en la familia MCKD15.



En el estudio de cosegregación del cambio W679X se puede ver que no se trata de una mutación espontánea, puesto que el individuo II.5 también lo tiene (*Figura 3.12.14*). Se ha visto la existencia de un patrón de herencia, puesto que una de las hermanas del afecto presenta también el mismo cambio. En la generación anterior, la ausencia del cambio en la madre nos hace pensar en la posibilidad de que éste tenga su procedencia de la línea paterna (muerto sin manifestación renal aparente).

La clínica en esta familia resulta un poco compleja, puesto que sólo se ha visto un afecto, con elevados niveles de ácido úrico en sangre y episodios de gota a una edad muy temprana, hipertensión arterial y sin quistes aparentes a nivel córtico-medular, lo que dificulta el diagnóstico en la familia.

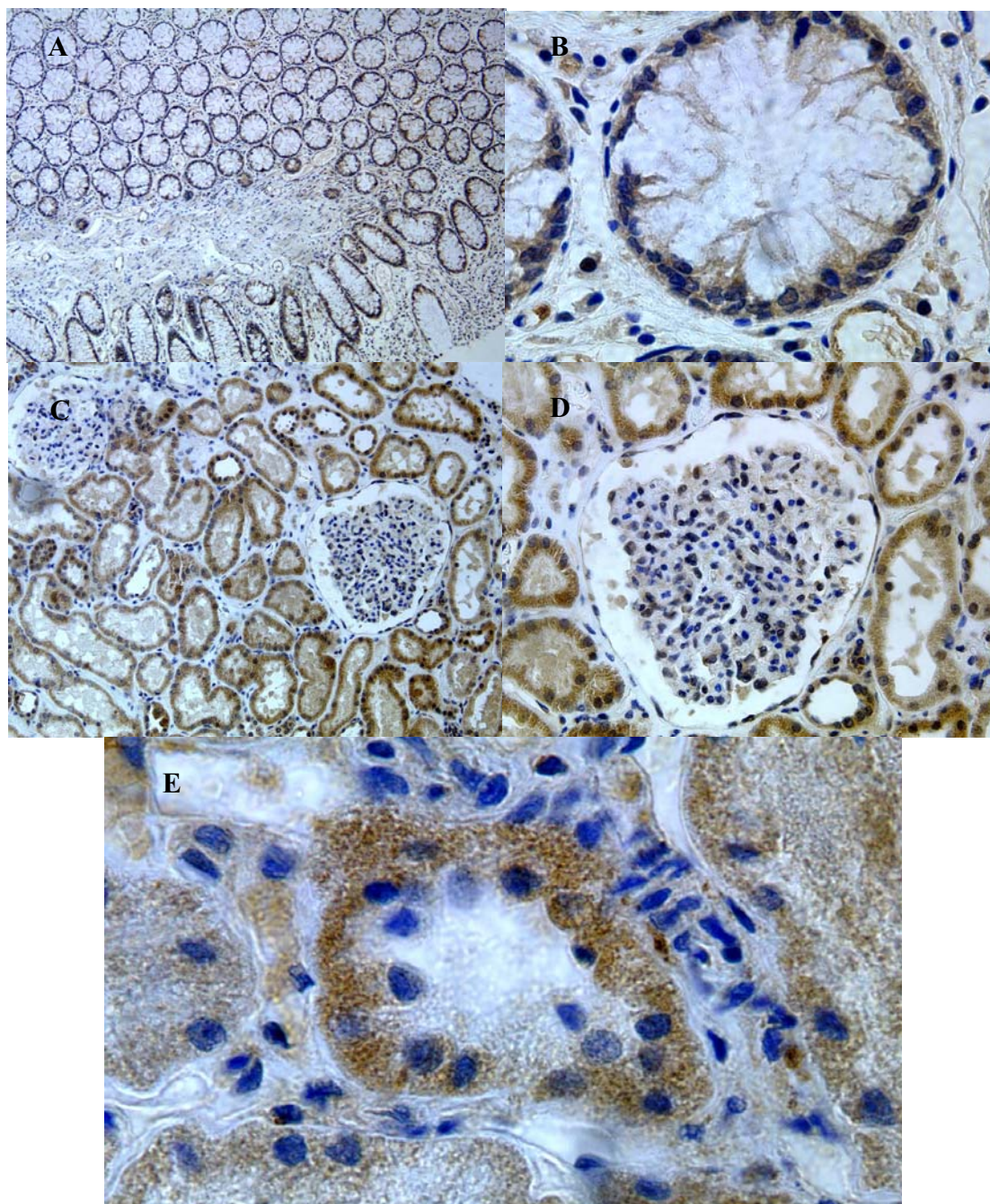
En cuanto al ligamiento al locus 1, si consideramos una transmisión por vía materna, suponiendo así también la afectación del tío materno, se puede excluir ligamiento al locus 1, ya que no comparten la mutación, pero si suponemos que la transmisión es por vía paterna se necesitarán más datos de otros familiares que nos ayuden a profundizar en la relación entre esta mutación y la MCKD tipo 1.

Análisis de Inmunohistoquímica de la proteína metargidina en riñón

La proteína metargidina se expresa principalmente en el corazón, riñón páncreas bazo y colon. Como control positivo se ha usado tejido sano procedente de colon. En él se puede apreciar una marcada reactividad no sólo en las células caliciformes que conforman la cripta (*Figura 3.12.15*.) si no también en las células intersticiales e incluso en las células endoteliales de los vasos. La distribución es principalmente citoplasmática excepto en las células caliciformes donde la tinción de la proteína presenta un patrón principalmente lateral. En el tejido renal sano analizado la tinción es también positiva. Las células mesangiales glomerulares son también positivas al igual que las células epiteliales del túbulo contorneado proximal, túbulo contorneado distal, asa de Henle y túbulo colector, las células intersticiales son negativas.

En el riñón, la distribución es principalmente citoplasmática, con ausencia de la localización en la membrana lateral observada en las células caliciformes.

Figura 3.12.15. Distribución de la proteína metargidina en colon y riñón. A. Expresión positiva células caliciformes y endoteliales. B. Distribución lateral y basal de células caliciformes. C y D. Tejido renal sano con tinción en glomérulos, túbulo contorneado proximal, túbulo contorneado distal y colectores. E. Tejido renal de paciente con mutación W679X.



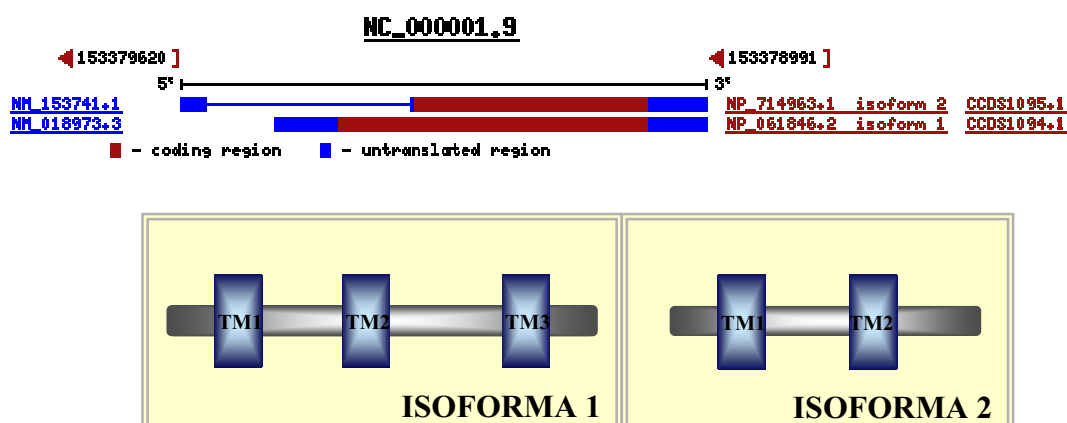
En el individuo II.3 con la mutación W679X la metargidina se localiza igualmente en células epiteliales tubulares, no se ha visto ninguna estructura glomerular, por lo que no se puede determinar su reactividad con el anticuerpo anti-metargidina. La distribución citoplasmática resulta similar a la detectada en controles sanos, por lo que

no se puede determinar si existe un efecto patogénico de esta mutación a nivel renal ni establecer una relación con la MCKD tipo 1.

3.3.2.7. Gen candidato DPM3

El gen DPM3 (*Dolichol-phosphate mannose (Dol-P-Man)*) (GeneID: 54344) se encuentra en la posición 153378991, compuesto por un único exón, del que existen dos formas de *splicing* distintas (Figura 3.12.15), que codifican para una proteína de 122 aminoácidos para la variante de mayor tamaño y otra de 92 aminoácidos para la forma pequeña.

Figura 3.12.16. Gen DPM3. Distribución de su exón y regiones UTR del gen. Variantes de *splicing* de Dol-M-Man.



Se ha visto que su función principal es ser donante de residuos manosil en la cara luminal del retículo endoplásmico. La pérdida de *Dol-P-Man* provoca la expresión alterada de proteínas de membrana ancladas a GPI, que es sintetizada a partir de una GDP-manosa y dolicol-fosfato en el retículo por el enzima dolicol-fosfato manosiltransferasa.

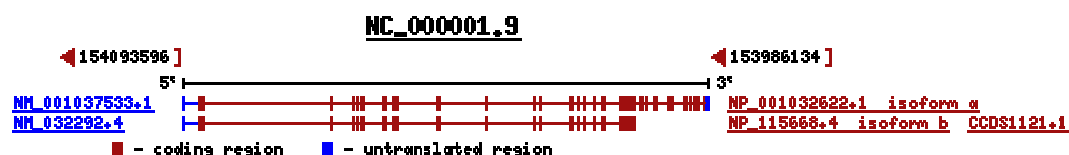
La proteína sintetizada por este gen realmente es una subunidad de este dolicol-fosfato manosiltransferasa, actuando como subunidad estabilizadora del complejo enzimático. El hecho de que se hubiese visto la pérdida de apicalidad en proteínas ancladas a GPI nos hizo pensar en este gen como un candidato excepcional, puesto que además de encontrarse en la región candidata, alteraciones en esta subunidad impedirían

el correcto anclaje de la molécula de GPI a la uromodulina ya a nivel del retículo, impidiendo así su transporte hacia la membrana apical y mostrando el mismo patrón de retención que el visto para los afectos con uromodulina mutada. Tras la secuenciación directa del exón 1, regiones UTR y una pequeña región promotora se concluyó que no era responsable de la enfermedad puesto que no se pudo detectar ni un solo cambio en toda la zona escaneada.

3.3.2.8. Gen candidato AK000210

El gen AK000210 fue identificado examinando una duplicación en tandem en el cromosoma 1 y confirmado por RACE y RT-PCR ⁽⁹⁸⁾ identificándose dos transcritos distintos para el gen GON4L. El transcrito completo codifica una proteína de unos 2221 aminoácidos, en la región C-terminal de la proteína se sitúa un dominio de unión al ADN (*SANT DNA-binding domain*).

Figura 3.12.17. Gen AK000210. Distribución de su exón y regiones UTR del gen. Variantes de splicing de GON4.



El otro transcrito es interrumpido en el intrón 21 y codifica una proteína de 1529 aminoácidos que carece de este dominio SANT. Ambas formas contienen diversos motivos y dominios conservados evolutivamente, Gon4, ortólogo GON4 de *C. Elegans*, es un regulador de la gonadogénesis, por lo que se cree que podría ser un factor de transcripción con actividad de control del ciclo celular ⁽⁹⁸⁾.

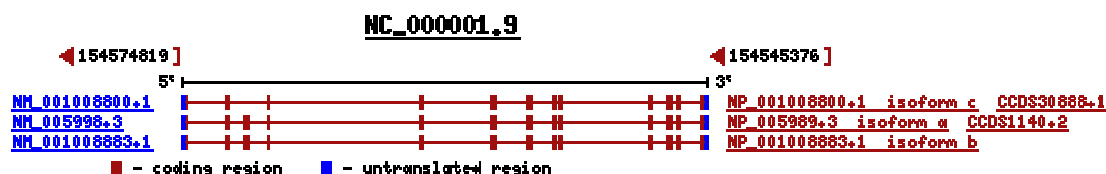
Se ha identificado un cambio nucleotídico que parece cosegregar con la enfermedad quística medular ligada al locus 1 ⁽⁹⁹⁾. En una familia turca se encontró el cambio *T442P*, (c. A1329C) en 7 pacientes afectos, no habiéndose detectado en 150 individuos sanos. Como una primera aproximación a la búsqueda de cambios en este gen se secuenció en primer lugar el exón 9 en donde se encontró el cambio. En nuestra

población no se encontró ningún cambio en este exón. Se está pendiente de secuenciar el resto del gen en busca de otros cambios posiblemente patogénicos.

3.3.2.9. Gen candidato CCT3

El gen CCT3 (GeneID:7203) codifica una chaperona molecular miembro del complejo TCP1 de chaperoninas, conocido también como complejo anillo TCP1 (TRiC). Este complejo está constituido por dos anillos apilados, cada uno con 8 proteínas diferentes. Las proteínas no plegadas penetran en la cavidad central del complejo para ser empaquetadas de forma ATP-dependiente. El complejo pliega diferentes tipos de proteínas entre las que se incluyen actinas y tubulinas ^(100, 101). Existen diversas variantes de splicing y cada una codifica para una isoforma distinta.

Figura 3.12.18. Gen CCT3. Distribución de su exón y regiones UTR del gen. Variantes de splicing de la chaperona.



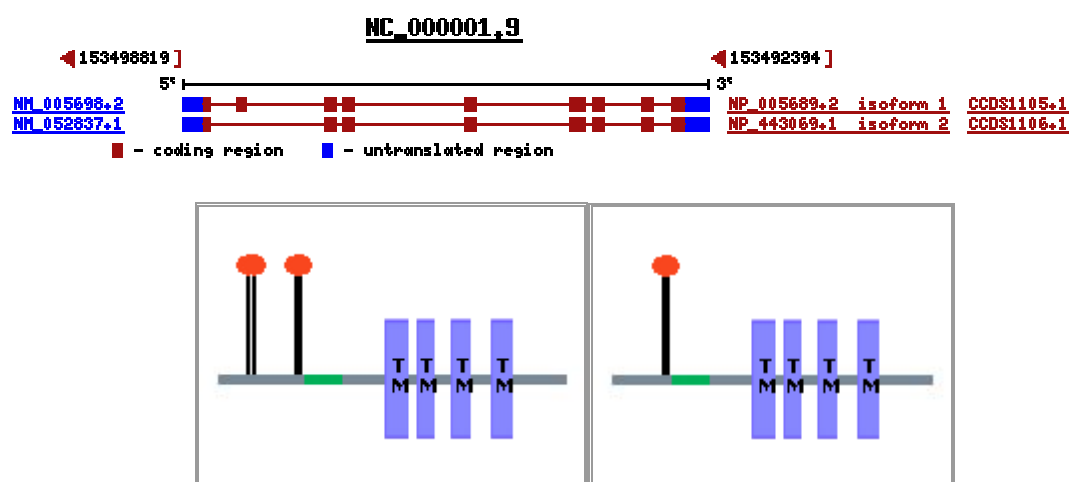
El mal plegamiento de la uromodulina impediría su correcto transporte hacia la membrana apical provocando su retención citosólica para su posterior degradación lisosomal, por este motivo esta chaperona es un buen candidato a considerar. En este gen se han descrito dos cambios distintos en 3 pacientes con enfermedad renal quística medular ⁽⁹⁹⁾, uno de ellos identificado en homocigosis. Se han analizado los exones 12 y 13 en busca de los cambios *T470I* (c. C1458T) y *L390F* (c.C1244T) en nuestra cohorte pero no se ha detectado ningún cambio. Es necesario analizar todo el gen para poder confirmarlo o descartarlo como responsable de la enfermedad.

3.3.2.9. Gen candidato SCAMP3

El gen SCAMP3 (GeneID:10067) se encuentra en la posición 153492394, presenta dos variantes de splicing distintas, la forma larga con 9 exones y la corta con 8,

y abarca una región de 6,4 Kb ⁽¹⁰²⁾ que codifica para una proteína de 347 y 321 aminoácidos respectivamente (*Fig. 3.12.18*). El producto génico de este gen pertenece a la familia SCAMP, familia de proteínas transportadoras desde el post-Golgi hasta la superficie apical mediando rutas de reciclaje.

Figura 3.12.19. Gen SCAMP3. Distribución de su exón y regiones UTR del gen. Variantes de splicing y transcritos.



El gen SCAMP3 se aisló parcialmente a partir de una librería de ADNc de células HeLa y presenta una elevada homología con el gen SCAMP1 ⁽¹⁰³⁾, la proteína propina 1, resultado de la traducción de este gen, contiene 4 dominios transmembrana, una región rica en prolina y leucina, hacia la región c-terminal muestra una región rica en alaninas. Se ha identificado un cambio en el exón 1 **D6N** en 3 familias con ligamiento al locus 1 según datos de Wolf MT y colaboradores, 2006 ⁽⁹⁹⁾ en un total de 7 afectados y no se detectó en 150 individuos sanos. Tras el análisis de esta región se identificaron 3 nuevos pacientes en nuestra población que también tenían el cambio, lo que hizo pensar en que podría tratarse de un cambio patogénico.

Conservación de la proteína

Se analizó el nivel de conservación evolutiva de la proteína para identificar el grado de conservación de este aminoácido.

Figura 3.12.20. Conservación proteica evolutiva de la proteína propina 1. En rojo aparecen los aminoácidos en los que se ha detectado el cambio.

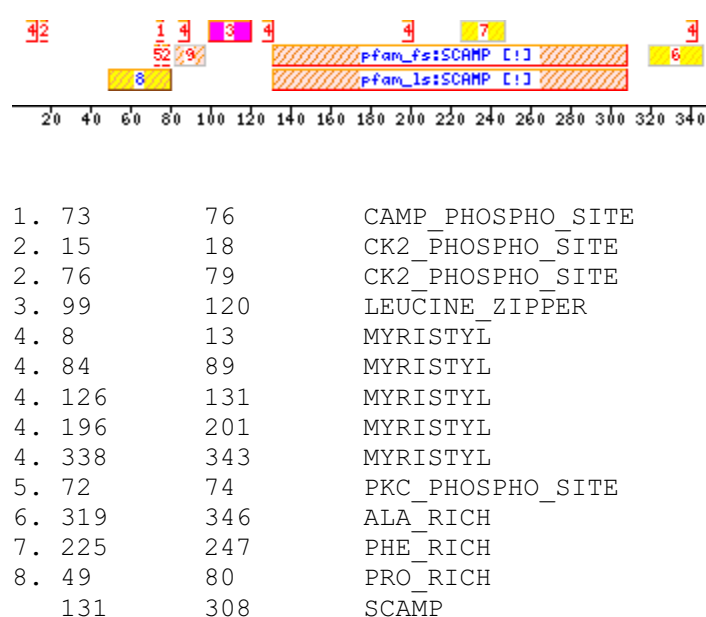
H-sapiens	-----MAQSRDGGNPF
P-troglodytes	-----MAQSRDGGNPF
C-familiaris	-----MAQSRDGENPF
M-musculus	-----MAQSRDTGNP
R-norvegicus	RGGPGSLANMAQNRDGGNPF
	. ** . . .**.*****.***
H-sapiens	AYEP--PAPAPLPPPSAPSLQPSRKLSPT
P-troglodytes	AYEP--PAPAPLPPPSAPSLQPSRKLSPT
C-familiaris	AYEP--PAPAPLPPSPSPALQSSRKLSPT
M-musculus	AYEPPAPAPAPLPPPSAPSVQSSRKLSPT
R-norvegicus	AYEPPAPAPAPLPPPSAPSVQSSRKLSPA
	**** *****.*****.:*****.:*****.:*****.
H-sapiens	AEELDRRERELQHAALGGTATRQNNWPL
P-troglodytes	AEELDRRERELQHAALGGTATRQNNWPL
C-familiaris	AEELDRRERELQHAALGGTATRQNNWPL
M-musculus	AEELDRRERELQHVAGGAGTRQNNWPL
R-norvegicus	AEELDRRERELQHVAGGAGTRQNNWPL
	*****.****.:*****.:*****.:*****.
H-sapiens	LWMCSE-----TLALLLNFLACLASFCV
P-troglodytes	LWMCSE-----TLALLLNFLACLASFCV
C-familiaris	LWMCSEYVLYLCPGLSTLALLLNFLACLAS
M-musculus	LWMCSE-----TLALLNFFACLARFCVD
R-norvegicus	LWMCSE-----TLALLNFFACLARFCVD
	****.*****.:**** **.:..:*****.:*.:*****.
H-sapiens	PMYKAFRSDSSFNFFVFFFIFFVQDVLF
P-troglodytes	PMYKAFRSDSSFNFFVFFFIFFVQDVLF
C-familiaris	PMYKAFRSDSSFNFFVFFFIFFVQDVLF
M-musculus	PMYKAFRSDSSFNFFVFFFIFFVQDVFF
R-norvegicus	PMYKAFRSDSSFNFFVFFFIFFVQDVFF
	*****.:*****.:**** :.**:***
H-sapiens	LLVALLFTGIAVLGIVMLKRIHSLYRRT
P-troglodytes	LLVALLFTGIAVLGIVMLKRIHSLYRRT
C-familiaris	LLVALLFTGIAVLGIVMLKRIHSLYRRT
M-musculus	LLDALFTGIAVLGIVMLKRIHSLYRQT
R-norvegicus	LLVALLFTGIAVLGIVMLKRIHSLYRQT
	** *****.*****.:*****.:*****.
H-sapiens	AENAFRAP
P-troglodytes	AENAFRAP
C-familiaris	AENAFRAP
M-musculus	AENAFRAP
R-norvegicus	AENAFRAP

El alineamiento múltiple aminoacídico mostró que la propina 1 tiene una elevada identidad con las propinas 1 de otros organismos, con una alta conservación evolutiva, lo que implica que esta proteína juega un importante papel en el transporte de proteínas.

Predicción de los dominios.

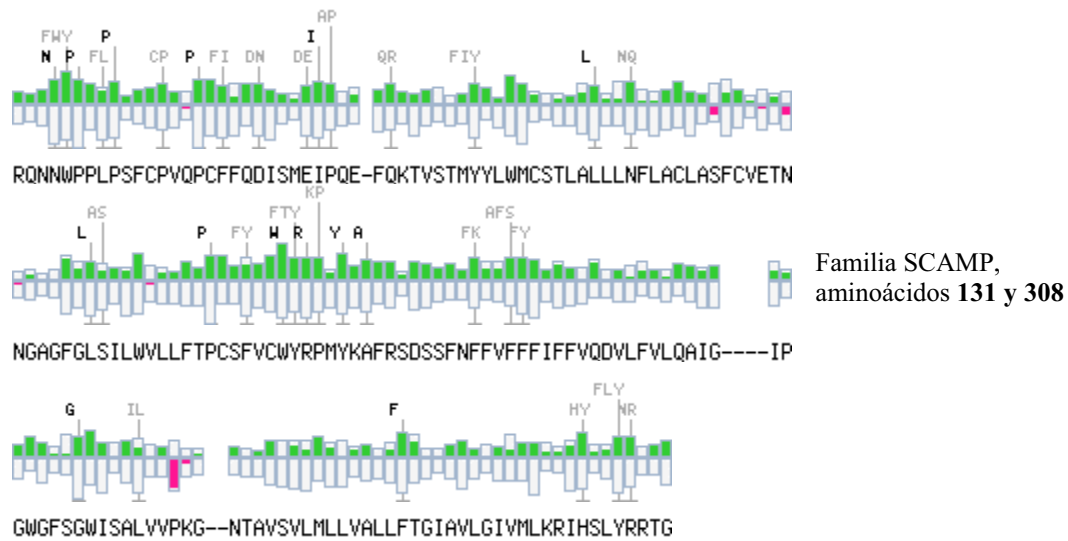
Usando la base de datos motifScan ⁽⁹⁷⁾ se ha hecho una predicción de los dominios funcionales más importantes de la proteína y se ha encontrado además de los descritos en la *Figura 3.12.20* los siguientes dominios:

Figura 3.12.21. Predicción de dominios estructurales por alineamientos locales en la base de datos Prosite y ubicación en la proteína.



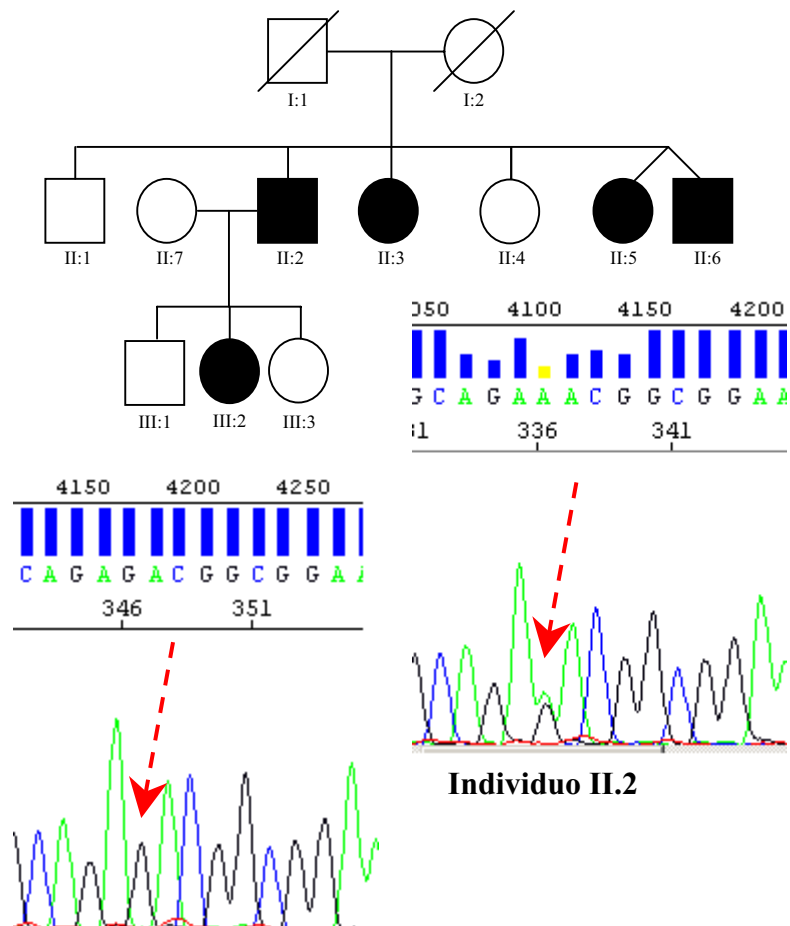
Por alineamientos globales con proteínas ya conocidas se reconocen una serie de motivos aminoacídicos de fosforilación y miristilación, y también se reconocen lugares ricos en alanina, fenilalanina y prolina. El cambio **D6N** no aparece incluido en ninguno de los dominios identificados para la propina 1, por lo que funcionalmente no se puede concretar su patogenicidad.

Figura 3.12.22. Predicción de dominios estructurales por alineamientos locales en la base de datos Prosite y ubicación en la proteína. Identificación del dominio que caracteriza la familia de proteínas SCAMP.



Estudio de cosegregación del cambio D6N

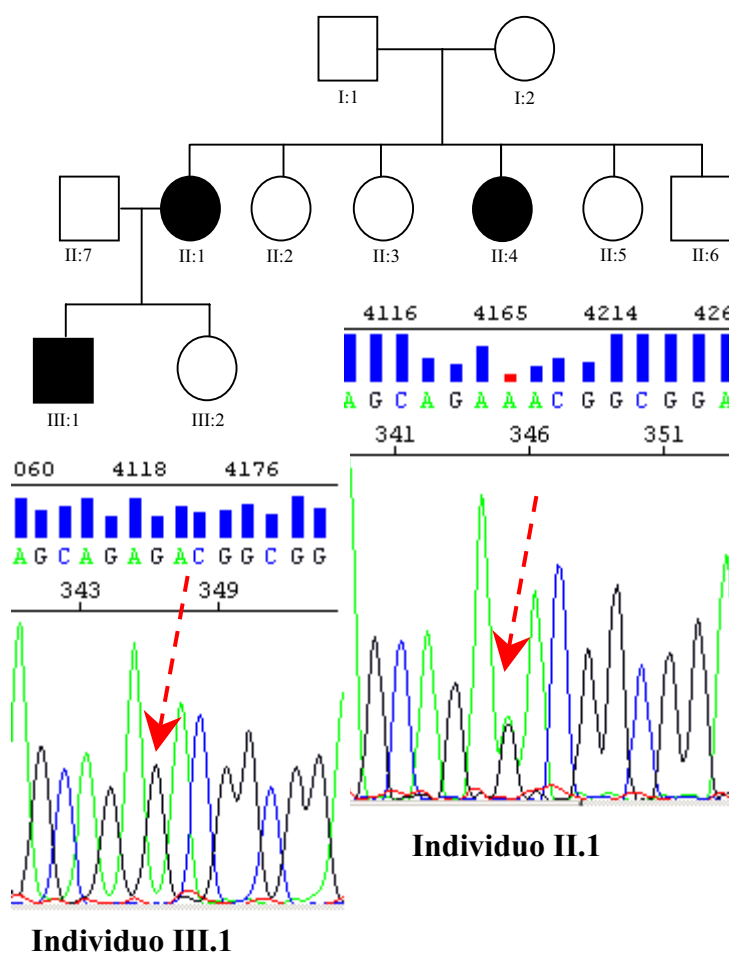
Figura 3.12.23. Estudio de cosegregación en la familia 47 del cambio D6N. Se excluyó como candidato de la enfermedad por estar presente en el individuo II.2 y ausente en el individuo III.2



Para poder evaluar el cambio **D6N** y su papel en la patogénesis de la enfermedad se han ampliado dos de las tres familias (**F10**, **F45** y **F47**) en las que se identificó el cambio. El cambio consistía en la sustitución de una G por una A en el nucleótido 269.

Tras analizar el cambio en las familias F 10 y F17 se descartó no sólo el cambio sino también el gen como patogénico por estar presente en una misma familia en tan sólo uno de los dos afectos estudiados.

Figura 3.12.24. Estudio de cosegregación en la familia 10 del cambio D6N. Se excluyó como candidato de la enfermedad por estar presente en el individuo II.1 y ausente en el individuo III.1



3.4. DISCUSIÓN

La cohorte objeto de estudio consta de un total de 46 familias procedentes de diversas regiones, en el territorio nacional: Madrid, Canarias, Ciudad Real, Ourense, Pontevedra y A Coruña y de USA de Baltimore, diagnosticadas como Nefropatía Intersticial basándose en dos criterios fundamentales: histología característica de daño intersticial o en su defecto datos clínico específicos. Dentro de este grupo de Nefropatía Intersticial se han agrupado, en función del modo de transmisión de la enfermedad dos subgrupos, uno de ellos con patrón de herencia autosómica dominante, compuesto por 37 familias, diagnosticadas como MCKD y 9 individuos con Nefropatía Intersticial esporádica acompañada de retraso mental y/o hepatopatía y/o retinosis pigmentaria y/o hipoacusia.

Ligamiento al locus 1 (cromosoma 1q21)

La MCKD es una enfermedad clasificada como rara por su baja incidencia, 1 de cada 10000. Se caracteriza por la presencia de hiperuricemia o artritis gotosa como manifestación clínica más común, acompañada de anemia, poliuria y polidipsia con fallo progresivo hacia insuficiencia renal terminal entre la 3ª y 5ª década de vida ^(13, 9). La presencia de quistes córtico-medulares no es un síntoma común, pese a que la enfermedad reciba este nombre, es por ello que se habla de una gran variabilidad fenotípica de la enfermedad, debida, en su mayor parte a la heterogeneidad genética existente.

En la MCKD existen al menos tres locus identificados, pero sólo se conoce un gen implicado en la patogenicidad, responsable de la MCKD tipo II ⁽⁵²⁾. Se han identificado 32 mutaciones distintas en el gen UMOD, por lo que no se puede hablar de un punto caliente de mutaciones, aunque sí de una “región caliente de mutaciones” ya que la mayoría se localizan en el exón 4. Se ha hecho un estudio mutacional del gen UMOD en las 37 familias de MCKD, encontrándose mutaciones en tan sólo cuatro de ellas, 3 en el exón 4 y una en el exón 5 ^(104, 105).

En las treinta y tres familias restantes no se ha identificado todavía el gen responsable de la enfermedad. El gen UMOD responsable de la MCKD2 codifica para una proteína conocida como uromodulina o *Tamm-Horsfall protein*, glicoproteína de membrana anclada por un GPI ⁽⁵⁶⁾, con 3 ó 4 dominios EGF ^(53, 54, 104) y un dominio *zona pellucida* responsable de la polimerización luminal de monómeros de uromodulina ⁽⁵⁵⁾.

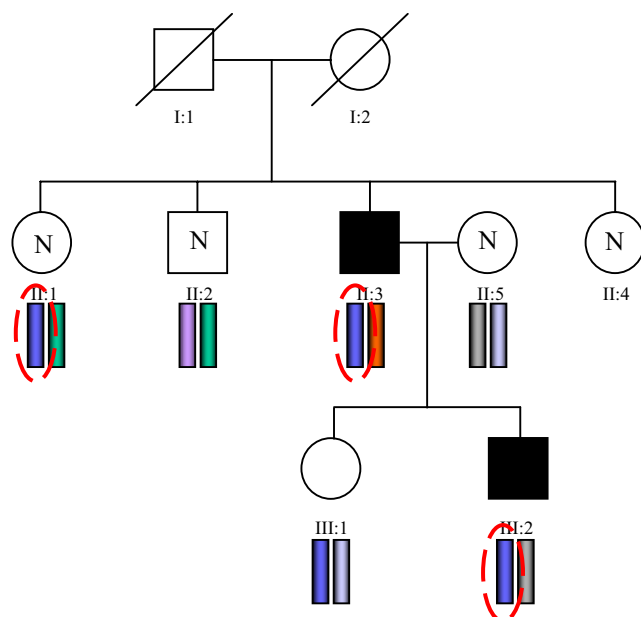
En la patogénesis de la enfermedad, la uromodulina juega un papel primordial en las tres formas identificadas de la enfermedad, puesto que como patrón común se observa una hipoexcreción de la uromodulina ^(31, 66). La interrupción de los residuos de cisteína que forman puentes disulfuro provoca aparentemente la retención de la proteína a nivel del retículo endoplásmico, impidiendo su llegada hacia la membrana apical, y provocando posiblemente la disminución de la excreción al torrente urinario ⁽⁵²⁾.

Para identificar el gen responsable de MCKD1 se han analizado cinco marcadores microsatélite distintos en 10 familias con historia familiar independiente formadas al menos por tres individuos en dos generaciones distintas, obteniéndose ligamiento aparente para tres de ellas, cuatro familias con ligamiento no significativo y tres familias que no ligan al locus 1.

La existencia de un haplotipo compartido entre familias con MCKD es una teoría propuesta y analizada en diversos estudios ^(98, 106). Se han descrito una serie de familias de distinto origen geográfico y con genealogías independientes con un mismo haplotipo, acotándose en el primer estudio una región de 650 Kb y en el segundo una región de 1,2 Mb, (adyacentes). Para la primera región se llevó a cabo el análisis mutacional del gen RhBG, descartado como patogénico ya que se encontraron cambios significativos en la proteína que no cosegregaban con la enfermedad. En el segundo trabajo se analizaron 37 genes entre los marcadores **D1S305** y **D1S2624**, en 6 familias distintas que con un haplotipo común. Los cambios detectados no fueron concluyentes porque no eran comunes a todas las familias, lo que hace pensar en dos posibilidades: una es que la hipótesis de haplotipos compartidos es un artefacto del azar y otra posibilidad es que realmente exista más de un gen implicado en la patogénesis de la enfermedad en esta región ⁽⁹⁸⁾.

En nuestro estudio, se analizó la posibilidad de la existencia de haplotipo compartido en las 7 familias que no descartaron ligamiento al locus 1, pero ninguna de

ellas compartía haplotipo. Este resultado puede deberse principalmente al bajo número de marcadores elegidos, pero teniendo en cuenta la distancia de la región el número de recombinaciones posibles es muy pequeño, por lo que no es de esperar que este efecto esté enmascarado por su existencia.



Analizar individuos afectados de una familia sin analizar individuos sanos puede alterar los resultados, por ejemplo en la familia MCKD13, los dos individuos afectados comparten un mismo haplotipo (3 7 7 1 4), si sólo se posee información de estos dos afectados se puede presuponer que existe ligamiento a esta región, porque además de compartir el haplotipo no tienen mutación en el gen UMOD.

Cuando se analiza el individuo sano II.1 se ve que éste comparte el mismo haplotipo, lo que determina que el ligamiento a esta región es incorrecto. La hipótesis de haplotipo compartido es ocurrente y acertada pero debe ser analizada bajo unos criterios más estrictos.

Ligamiento al locus 3 (cromosoma 1q41)

Recientemente ha sido publicada la localización de un nuevo locus ligado a la enfermedad en el cromosoma 1 en la región 1q41 en una familia de origen belga⁽³¹⁾ con anemia, hiperuricemia, poliuria, riñones de pequeño tamaño y sin quistes. Mediante estudios de inmunohistoquímica en los afectados de esta familia se pudo comprobar una asociación patológica con la uromodulina, lo que les llevó incluso a nombrarla como **UAKD** (*Uromodulin Associated Kidney Disease*) “Enfermedad del riñón asociada a la uromodulina”, donde se podía apreciar una clara disminución de la expresión de la uromodulina. Objetivos principales a investigar en esta región como candidatos serían

factores de transcripción génica u hormonas reguladoras de la expresión. Mutaciones en este tipo de proteínas justificarían el bajo nivel de expresión observado. Mediante secuenciación directa se excluyeron 8 genes implicados en la regulación génica como responsables de la enfermedad.

La región acotada abarca unos 30 cM en los que se incluyen cerca de unos 300 genes, por lo que aplicar directamente una estrategia de secuenciación directa sería bastante complicado.

Para el estudio de ligamiento en esta región se han usado 9 marcadores microsatélite distintos (*DIS3470*, *DIS1660*, *DIS1723*, *DIS245*, *DIS425*, *DIS217*, *DIS419*, *DIS2141*, *DIS1644*). En el análisis de haplotipos no se ha podido identificar ninguna familia con ligamiento a esta región, ya que en ninguna se ha visto un LOD Score mayor de 3. Esta falta de potencia estadística es debida principalmente al pequeño tamaño de las familias analizadas y a la dificultad de establecer el estado de afectación de las últimas generaciones por tratarse de individuos jóvenes.

Tan sólo las familias F6 y F33 son informativas puesto que tras excluir ligamiento a los 3 loci identificados, ponen de manifiesto la existencia de al menos un cuarto locus implicado en la enfermedad.

Variabilidad Fenotípica de la MCKD

Bajo el término de nefropatía intersticial se engloban distintas enfermedades como pueden ser la nefronoptosis y la MCKD. Su descripción en la literatura ha sido bastante confusa, debida en gran medida a la complejidad de su diagnóstico. Histológicamente son enfermedades indistinguibles caracterizadas por una nefropatía túbulo-intersticial crónica, con formación de quistes en la unión córtico-medular y evolución a insuficiencia renal terminal ^(9, 13). Probablemente la clave de la diferenciación reside en el tipo de herencia, dominante o recesiva y edad de debut, pediátrica para la nefronoptosis y edad adulta en la MCKD ⁽¹⁰⁾. Incluso en la MCKD, la variabilidad fenotípica observada es muy elevada ⁽¹²⁾.

- Variabilidad Interfamiliar

Puede ser debida a la existencia de heterogeneidad genética, con un único gen identificado pero dos loci más descritos. Como ya se ha comentado anteriormente, la presencia de quistes medulares que pone nombre a la enfermedad no está siempre presente, lo mismo sucede con la hiperuricemia o artritis gotosa, anemia, poliuria o polidipsia que caracterizan la enfermedad. Se ha hecho un análisis de las distintas familias en función de la región implicada en la enfermedad y se han analizado la presencia/ausencia de hiperuricemia, quistes medulares y edad de IRCT, no detectándose ningún rasgo concreto o común exclusivo para el locus 1 o para el locus 2.

Al analizar la severidad de la enfermedad sí se pudo detectar una diferencia significativa en cuanto a la edad de IRCT, mediante el estudio estadístico de supervivencia se ha podido comprobar una mayor severidad de la enfermedad asociada al locus 1 con una media de IRCT de 39,37 años frente a los 57,11 años de media de IRCT para el locus 2 ($p=0,00692178$).

<i>Heterogeneidad Genética</i>	<i>IRCT</i>	<i>Hiperuricemia</i>	<i>Gota</i>	<i>Quistes medulares</i>
LOCUS 2 (N=4)	73, 55, 22, 65, 61, 50, 58, 66, 60, 56, 45, 42, 70, 67, 64, 62, 55	F1, F5, F8, F30	F1, F5, F8, F30	F1, F8
LOCUS 1 (N=3)	42, 27, 41, 35, 43, 32, 30, 68,	-	F6, F29	F6, F20

- Variabilidad Intrafamiliar

Incluso en una misma familia se han visto fenotipos diferentes. La justificación más clara está en el efecto ambiental, principalmente en cuanto a la presencia o ausencia de hiperuricemia o artritis gotosa. El ácido úrico puede tener diversas etiologías y verse alterado por ejemplo en función de la dieta (dietas ricas en purinas como por ejemplo abuso de carnes rojas, vísceras de animales, embutidos, mariscos o frutos secos aumentan los niveles de ácido úrico en sangre), estrés, hipoparatiroidismo, diabetes etc.

La presencia de quistes córtico-medulares es también un rasgo variable en la misma familia. Esta diferencia intrafamiliar puede deberse por ejemplo a la edad en la que se realice la ecografía, puesto que en ocasiones se manifiestan en etapas tardías.

Análisis de genes candidatos en el cromosoma 1q21.

Se han elegido 9 genes candidatos en la región acotada, todos ellos codifican proteínas con expresión renal y presentan funciones que podrían incluirlos en la misma ruta de señalización que la uromodulina.

El gen DPM3 fue seleccionado por su implicación en la biosíntesis de proteínas ancladas a una molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI), la alteración del anclaje de un GPI a una proteína GPI impide su transporte hacia su lugar de origen a nivel del retículo, por lo que mutaciones en este gen serían compatibles con el patrón de retención citosólico de la uromodulina, pero tampoco se ha detectado ningún cambio en su exón en ninguna de las variantes de *splicing*, por lo que se descarta como gen responsable.

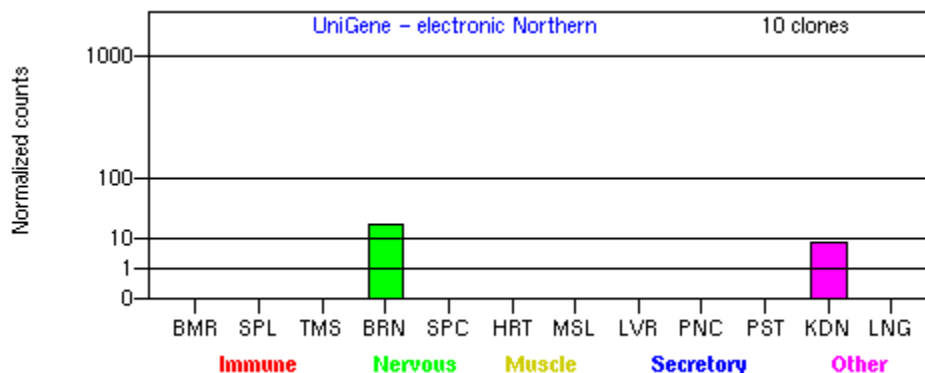
El gen NCU fue seleccionado principalmente por ser el riñón el tejido en el que se expresa predominantemente. Su función es desconocida, pero también se ha descartado como responsable de la enfermedad por análisis mutacional. Lo mismo sucede con el gen APOA1-BP, que codifica para una proteína del túbulo contorneado proximal de unión a la apolipoproteína A1, que tras el estudio de cosegregación de sus cambios se ha excluido como candidato.

El gen EFNA1 codifica para una proteína conocida como efrina A, de expresión renal, pero también descartada por la ausencia de cambios patogénicos tras el análisis mutacional de todo el gen.

Gen Candidato EFNA3

En cuanto al gen EFNA3, al analizar sus cinco exones se detectó una delección *in frame* en heterocigosis en 1 paciente con MCKD, inicialmente se descartó como patogénica puesto que se encontró también en un individuo control, también en heterocigosis. En uno de los individuos diagnosticados con nefropatía intersticial asociada a otros fenotipos se detectó esta misma delección en homocigosis. Al

comprobar la cosegregación familiar, el cambio fue detectado también en heterocigosis en sus progenitores. El individuo homocigoto presentaba además de la nefropatía intersticial, hepatopatía y retraso mental. Aunque la proteína se expresa principalmente en el riñón, el lugar predominante es el cerebro.



Mutaciones en esta proteína son compatibles con un fenotipo con manifestaciones renales y también en el cerebro, lugar donde se ha visto íntimamente ligada al desarrollo de las espinas astrocíticas. El receptor EphA4 se expresa principalmente en espinas dendríticas del hipocampo piramidal regulando su morfología y organización mediante interacciones con la efrina A3 ⁽¹⁰⁷⁾. La inhibición de la activación del receptor provoca la desorganización morfológica de la dendrita, provocando la interrupción de la comunicación entre astrocitos y neuronas. Se ha visto una serie de enfermedades neurales asociadas a retraso mental con un anormal desarrollo y formas irregulares de estas espinas dendríticas ⁽¹⁰⁸⁻¹¹⁰⁾.

La región delecionada se encuentra ampliamente conservada en el hombre y en el *mono rhesus*, pero está ausente en otros organismos, y tras la predicción de dominios proteicos se ha visto que afecta al dominio efrina característico de todas las proteínas de la familia.

Para poder determinar la implicación de esta delección en la patogénesis de la nefropatía intersticial asociada a retraso mental es necesario recurrir u otro tipo de estudios relacionados con la funcionalidad de la proteína. Sería interesante comprobar el efecto de este ligando alterado por mutagénesis dirigida en la actividad del receptor EphA4 en un sistema *in vitro* y comprobar que efectivamente provoca su inhibición y la alteración de la morfología celular.

Gen Candidato ADAM15

El análisis de marcadores microsatélite del locus 1 en la familia MCKD15 no era significativo debido a la peculiar manifestación clínica de la enfermedad. El individuo II.3 padece artritis gotosa desde los 18 años, el estudio de inmunohistoquímica muestra nefropatía intersticial compatible con el diagnóstico de MCKD. En la generación anterior existen datos de hiperuricemia en la madre y en el tío, siendo de origen genético la enfermedad estaría asociada al haplotipo amarillo, haplotipo no compartido por el individuo II.3, lo que descartaría ligamiento a esta región.

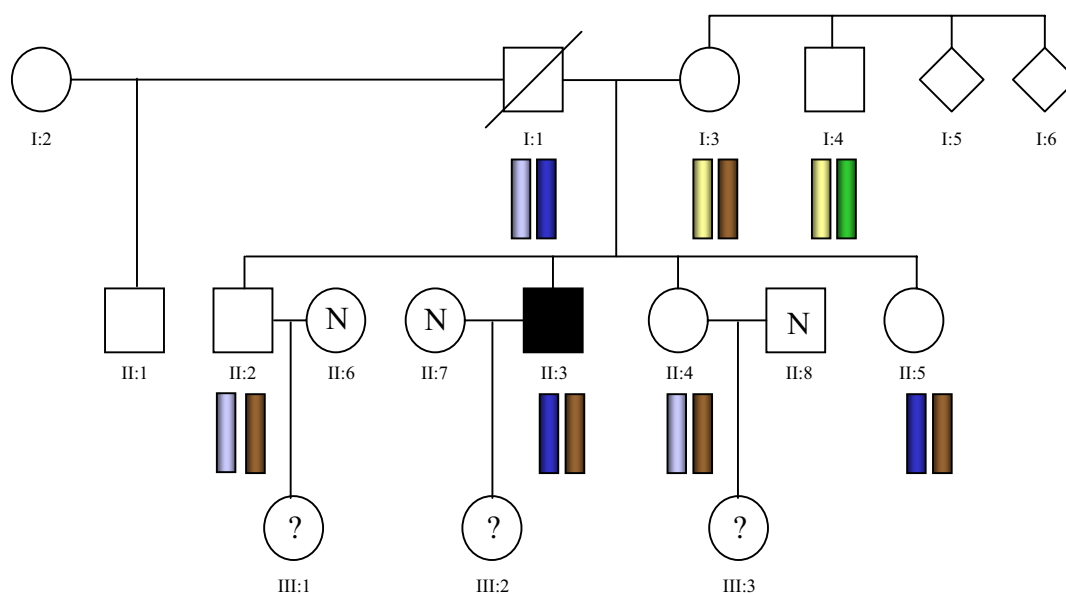
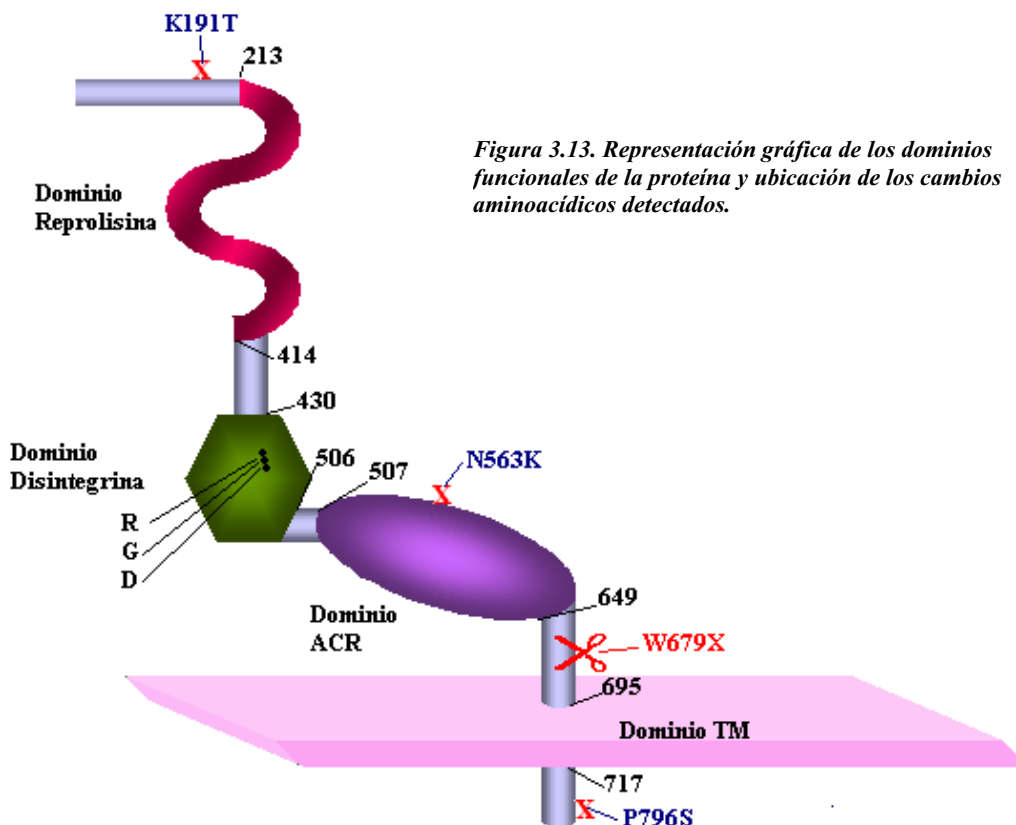


Figura 3.3.1-6. Pedigrí genealógico de la familia 15 con los haplotipos del locus 1.

No existen antecedentes familiares por vía paterna, o al menos no son conocidos, lo que si está claro es que sólo los individuos II.3 y II.5 comparten el haplotipo azul oscuro del padre al que claramente se encuentra asociado el cambio *nonsense* W679X detectado en los individuos II.3 y II.5 en el gen ADAM15. Este cambio altera la pauta de lectura normal de la proteína y la acorta unos 200 aminoácidos, región altamente conservada evolutivamente, lo que implica una función importante en esta región de la proteína. El codón de parada elimina el anclaje de la proteína a la membrana apical ya que pierde el dominio transmembrana existente entre los aminoácidos 695 y 717.

La familia ADAMs (*a disintegrin and metalloprotease domain*) es una familia de glicoproteínas de membrana tipo 1 implicadas en diversos procesos biológicos como adhesión celular y proteólisis de receptores de la superficie celular ⁽¹¹¹⁾. Se ha visto *upregulada* en placas arterioscleróticas ⁽¹¹²⁾, artritis reumatoide y osteoartritis ⁽¹¹³⁾, enfermedades intestinales inflamatorias ⁽¹¹⁴⁾.



Se ha visto también que contribuye a la dilatación cardíaca reduciendo interacciones célula-matriz por la vía de las integrinas ⁽¹¹⁵⁾, proteínas con las que interactúa por su dominio RGD, única proteína de esta familia que contiene este motivo triaminoacídico en su región disintegrina ⁽¹¹⁶⁻¹¹⁹⁾. El ratón ADAM15 ^{-/-} desarrolla alteraciones vasculares, mostrando una neovascularización disminuida con el desarrollo de retinopatía proliferativa ⁽¹²⁰⁾. Se ha visto también que la endofilina 1 y la proteína de procesamiento nexina 9 interactúan con el dominio citoplasmático de ADAM9 y ADAM15 ⁽¹²¹⁾, todas estas implicaciones sugieren que la metargidina es una molécula multifuncional, sugerida también por los distintos dominios que conforman su estructura.

El papel de la metargidina y sus variantes de “*splicing*” ha sido también objeto de diversos estudios ^(122, 123) en los que se ha podido comprobar su elevada “*upregulación*” en condrosarcomas, cáncer de pulmón, ovario, presente también en tejidos en proceso de remodelación ⁽¹²⁴⁾. La presencia del dominio metaloproteasa que provoca la degradación de la matriz extracelular ⁽¹²⁵⁾ permitiendo la migración celular, estrechamente relacionada con la capacidad de metástasis de ciertos tumores.

Los análisis de inmunohistoquímica realizados en tejido renal confirman la expresión de la metargidina en todas las estructuras que conforman la nefrona, glomérulo, túbulo contorneado proximal, asa de Henle y túbulo contorneado distal y colector. La distribución es principalmente citoplasmática, no se ha visto una marcada localización lateral como en las células caliciformes de criptas del colon. No se han detectado variaciones significativas en el patrón de distribución del individuo *II.3* portador de la mutación W679X. Estos resultados señalan la posibilidad de que esta mutación no tenga ningún efecto fenotípico renal, se precisa de más datos estructurales que permitan descartar o confirmar una relación directa entre la pérdida parcial de la metargidina con la MCKD tipo 1.

Han pasado ya 10 años desde la identificación del locus 1 y todavía no se ha podido relacionar un solo gen con la enfermedad, lo que pone de manifiesto la existencia de peculiaridades de la región cromosómica que dificultan la identificación. La región crítica de ligamiento de MCKD1 contiene diversos pseudogenes o regiones repetitivas adyacentes. Evolutivamente estas repeticiones surgen como duplicaciones génicas idénticas o con identidad elevada pero no funcionales. Recientemente se han visto pseudogenes implicados en la regulación de sus genes, y un caso muy parecido que sucede en la misma región es la enfermedad de Gaucher.

La enfermedad de Gaucher presenta un espectro de manifestaciones clínicas elevado. Se han identificado más de 100 mutaciones distintas en el gen de la glucocerebrosidasa ^(125, 126), algunas de las cuales, en concreto L444P encontrada en la secuencia de su pseudogen. En algunos pacientes este cambio se acompañaba de otro presente en el pseudogen provocando un “*cross-over*” entre GBA y su pseudogen ⁽¹²⁶⁾. Lo mismo podría estar sucediendo con la MCKD, por lo que es necesario determinar la presencia de pseudogenes en cada gen estudiado y analizarlos uno por uno comparándolos con los cambios ya detectados.

Se han analizado una serie de cambios descritos recientemente en la literatura en tres genes distintos de esta región ⁽⁹⁹⁾, AK000210, CCT3 y SCAMP3 en nuestra población afecta y se ha podido descartar el gen SCAMP3 como responsable de la enfermedad, ya que se han identificado dos familias distintas en las que uno de los afectados era portador del cambio, pero no afectados de otras generaciones descartando la cosegregación familiar del cambio.

Tabla 3.14. Cambios nucleotídicos en los genes AK000210, CCT3 y SCAMP3 descritos en la literatura contrastados con los resultados del laboratorio.

Gen	Exón	Cambio	Nº Afectos
<i>Literatura (99)</i>			
AK000210	9	T442P	7
CCT3	12	T470I	3
	13	L390F	
SCAMP3	1	D6N	6
<i>Datos del laboratorio</i>			
AK000210	9	T442P	0
CCT3	12	T470I	0
	13	L390F	0
SCAMP3	1	D6N	3

No se identificó ninguno de los cambios descritos para los genes AK000210 ni CCT3, por lo que es necesario analizar toda la región codificante de ambos genes en busca de más cambios.

IV. BÚSQUEDA DE OTROS LOCI IMPLICADOS EN LA MCKD

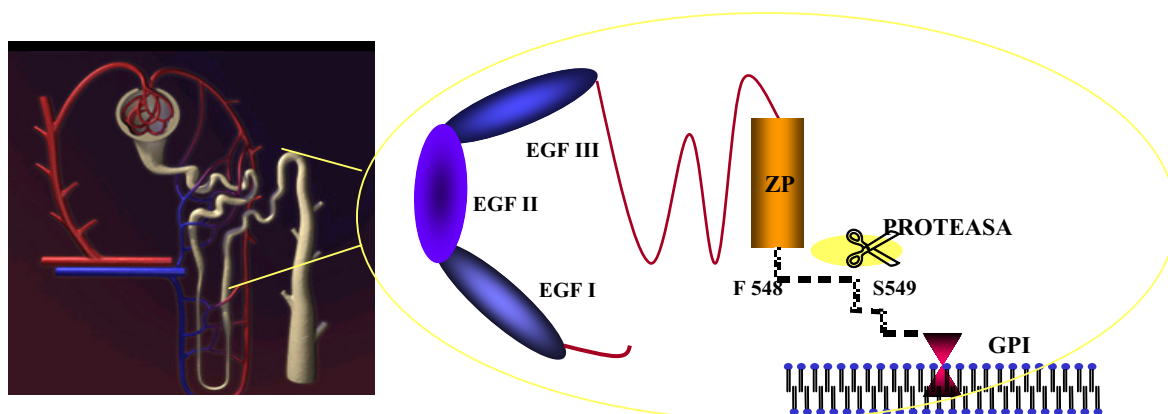
4.1. INTRODUCCIÓN

4.1.1. BÚSQUEDA DE OTROS GENES CANDIDATOS IMPLICADOS EN LA MCKD

Tal y como se ha descrito en el apartado 1.1 la Enfermedad Renal Quística Medular es un tipo de Nefropatía Intersticial Autosómica Dominante con afectación principalmente renal en la que la manifestación clínica más común consiste en la incapacidad de concentrar la orina, asociado a hiperuricemia con casos esporádicos de gota. La variabilidad existente en la enfermedad ⁽¹⁴⁻¹⁸⁾ podría estar ocasionada por la heterogeneidad genética descrita en los apartados anteriores.

Hasta el momento se tiene conocimiento de un único gen responsable de la enfermedad, se trata del gen UMOD responsable de la Nefropatía Intersticial Autosómica dominante tipo 2 (*MCKD2*; *MIM 603860*), localizada en el cromosoma 16 en la región 16p12-13 ⁽⁵¹⁾. Las mutaciones descritas en este gen afectan al transporte normal de su producto de expresión, la proteína uromodulina (Tamm-Horsfall Protein), desde su lugar de síntesis hasta la membrana apical.

Figura 4.1. Dominios de la proteína uromodulina, y expresión en TAL.



Esta interrupción en el transporte conlleva una disminución en la excreción normal de la proteína en la orina. Se sintetiza principalmente en una porción muy concreta de la nefrona, en el asa de Henle ascendente, *TAL*, (*Thick Ascending Limb of Henle*). La función concreta de la uromodulina no ha sido determinada todavía, aunque se le asignan distintos papeles tal y como se ha visto anteriormente.

Una de las características principales de la uromodulina es la presencia de un dominio GPI (*glycosylphosphatidylinositol*) de anclaje (GPI-anchor), que incluye y clasifica a la proteína dentro de la familia de “proteínas GPI”.

Existe una gran variedad de proteínas que son ancladas a la membrana plasmática por una pequeña molécula de glicosilfosfatidilinositol (*GPI*), por su cara extracelular, donde participan en diversos procesos que van desde catálisis enzimática a la adherencia celular ⁽¹²⁷⁻¹³⁰⁾.

La acumulación de uromodulina mutada en estructuras perinucleares en pacientes con Nefropatía intersticial es un hecho observado en distintos ensayos de inmunohistoquímica y microscopía electrónica ⁽⁵³⁾, siendo este el motivo principal que explica la disminución de la excreción de la uromodulina en la orina, ausente en pacientes homocigotos ⁽¹⁰⁴⁾. Las alteraciones en su distribución son comunes a todas las formas de Nefropatía Intersticial descritas, con retención a nivel intracelular en las formas ligadas al locus 1 y disminución de la expresión de la proteína en la forma ligada al locus 3 ⁽³¹⁾.

Estos hallazgos sugieren un papel esencial de la uromodulina en la patogenicidad de la Nefropatía Intersticial Autosómica Dominante, lo que nos ha llevado a pensar que proteínas implicadas en el transporte de la uromodulina hacia la membrana plasmática podrían estar íntimamente relacionadas con la patogenicidad de la enfermedad en otras formas todavía no detectadas.

4.1.1.1. Transporte intracelular de proteínas GPI

La regulación del transporte intracelular de proteínas y lípidos es uno de los principales retos para la biología celular. Los mecanismos reguladores de su clasificación y transporte de proteínas desde su lugar de origen, el RE, a su correcta ubicación final son escasamente conocidos. Lo que sí está claro es que las proteínas, transportadas por las distintas rutas de secreción, contienen señales específicas de clasificación. Estas señales pueden ser reconocidas por distintos receptores específicos y usados para continuar con su procesamiento o para ser recuperados por su compartimento original (por ejemplo el receptor de la manosa 6-fosfato)⁽¹³¹⁾.

La interacción entre proteínas y lípidos puede provocar unos mecanismos de clasificación diferentes. Las distintas membranas implicadas en la ruta de secreción poseen una composición lipídica diferente, esta heterogeneidad puede ser explicada en función de la localización enzimática de biosíntesis lipídica y en función del transporte de lípidos específicos hacia su lugar de síntesis o hacia otros destinos. Desde que se conoce que el transporte de lípidos entre distintos compartimentos citosólicos está mediado por vesículas transportadoras, se ha propuesto la existencia de ciertos dominios específicos como parte de su estructura, implicados en la clasificación de proteínas de membrana⁽¹³²⁾.

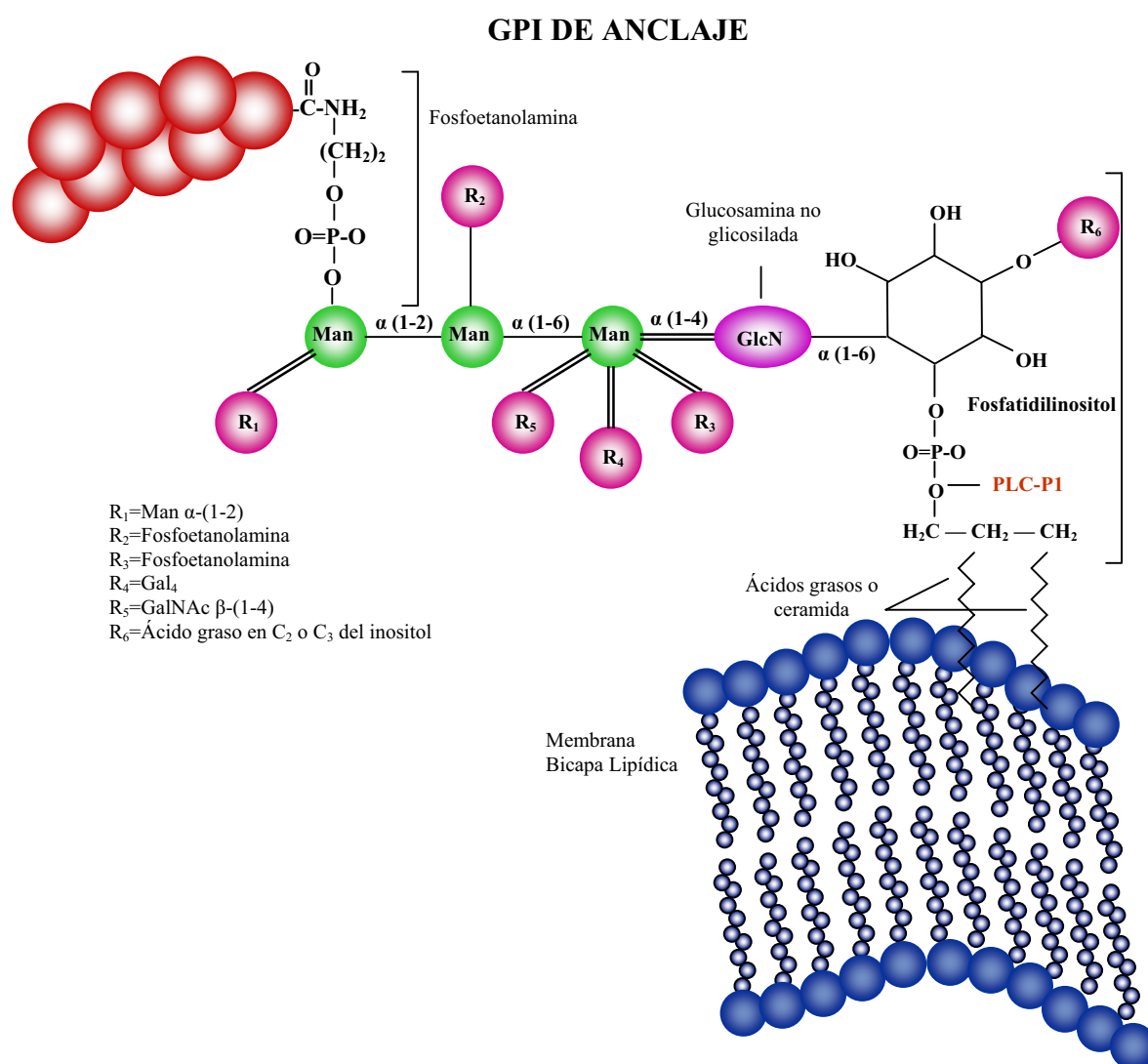
Las proteínas que se unen a GPI (*glicosil-fosfatidil-inositol fosfato*), son proteínas de unión a membranas y están presentes en todo el reino animal. Unen una molécula de GPI por su extremo carboxi terminal (C-terminal) por medio de un enlace fosfodiéster con una fosfoetanolamina y una glucosamina trimanosil no acetilada (Man₃-GlcN).

El extremo reducido de la glucosamina se une al fosfatidilinositol (PI), que finalmente se anclará a través de otro enlace fosfodiéster a la membrana celular mediante su región hidrofóbica. Tanto la estructura EthN-P-Man₃-GlcN-PI, como su biosíntesis se encuentran altamente conservadas entre los distintos organismos. Este proceso ocurre en el lumen del RE.

Las proteínas GPI pueden sufrir modificaciones en sus residuos de manosa y, en general, la estructura del lípido es en ocasiones modificada en una reacción de remodelación por otro lípido con gran contenido en cadenas saturadas aciladas ^(133, 134).

En células epiteliales polarizadas las proteínas que se localizan en la membrana apical o en la membrana basolateral son empaquetadas en vesículas que actúan a modo de transportadores intracitoplasmáticos ⁽¹³⁵⁾.

Figura 4.2. Estructura molecular de GPI y lugar de anclaje a proteínas.



Aparentemente, el transporte de proteínas integrales de la membrana basolateral parece estar mediada por señales clasificadoras en su región C-terminal. Estas señales

contienen motivos aminoacídicos de di-Leucina o Tirosina que son reconocidos por distintos complejos proteicos ^(136, 137).

En cuanto al transporte hacia la membrana apical el mecanismo principal esta basado en la formación de pequeños microdominios de membrana ricos en colesterol o esfingolípidos, también conocidos como *balsas lipídicas (lipid rafts)* ^(132, 135, 138). Las señales implicadas en el transporte hacia la membrana apical mediadas por *rafts* son distintas a las que determinan el transporte hacia la membrana basolateral, entre ellas se encuentran el anclaje a *glicosil-fosfatidilinositol (GPI)* ⁽¹³⁹⁻¹⁴¹⁾ o señales específicas localizadas en los dominios transmembrana de proteínas apicales no ancladas por GPI ^(142- 144).

Tras el estudio de diversas proteínas GPI y la comprobación de que todas aparecían en la membrana apical ^(145, 146) se determinó la señalización apical como su función principal. Incluso se estudiaron proteínas quiméricas con un dominio GPI fusionado a una proteína basolateral con liberación apical ^(139, 147, 148), aunque se pudo comprobar que no todas las células epiteliales presentaban el mismo comportamiento ⁽¹⁴⁹⁾.

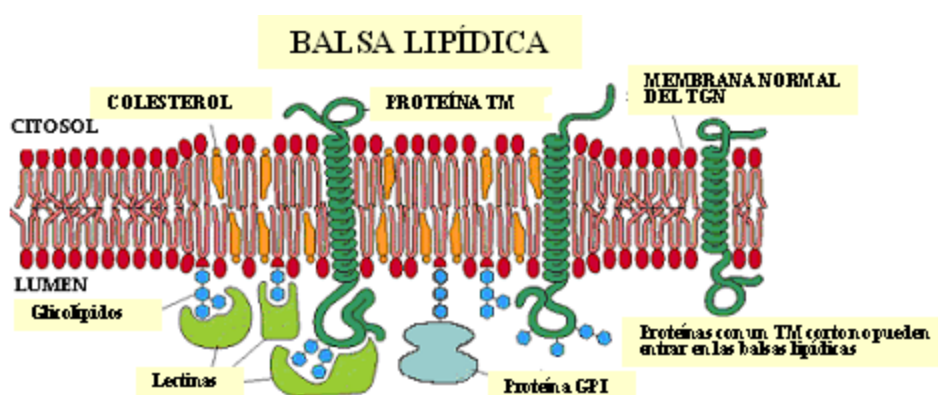
4.1.1.2. Función de las balsas lipídicas (lipid rafts) y transporte

Los glicolípidos que constituyen la membrana plasmática se asocian por sus largas cadenas aciladas formando agrupaciones muy compactas estabilizadas por los puentes de hidrógeno que se producen entre sus cabezas azucaradas. Poseen temperaturas altas de fusión ya que sus cadenas de hidrocarbonadas presentan un grado alto de saturación. Intercalado se encuentra el colesterol provocando una mayor rigidez de la bicapa que junto con los glicoesfingolípidos forma dominios dispersos conocidos como “lipid rafts” o balsas lipídicas ⁽¹⁵⁰⁾. Se caracterizan por ser insolubles en detergentes no iónicos (TritónX-100), facilitando su aislamiento por centrifugación ⁽¹⁵¹⁾. Su tamaño es considerablemente pequeño, de unos 70 nm por lo que no puede ser visto por técnicas convencionales de microscopía electrónica.

Se sabe que están implicados en el transporte de proteínas hacia la membrana apical. Los glicoesfingolípidos se agrupan en las membranas de la red Trans-Golgi (TGN), para actuar como plataformas de inclusión de proteínas *de cargo* destinadas a la

membrana apical, siendo excluidas las proteínas con destino a la membrana basolateral. Estos lípidos y proteínas se ensamblan para formar un subdominio formador de vesículas con la maquinaria necesaria para asegurar el transporte a la membrana apical, mientras que las proteínas con destino hacia la membrana basolateral son excluidas específicamente de las vesículas del transporte apical ⁽¹⁵²⁾.

Figura 4.3. Organización de la bicapa lipídica. Características de las Balsas lipídicas y principales componentes moleculares.



La organización de los *rafts* tanto para el transporte como para los procesos de señalización necesita proteínas específicas siendo las proteínas pertenecientes a la familia MAL ⁽¹⁵³⁾ y la caveolina ⁽¹⁵⁴⁾ los elementos mejor caracterizados hasta el momento.

Las caveolas son especializaciones de los *rafts* siendo idénticas tanto en su composición como en sus propiedades bioquímicas, por lo que se aíslan con los mismos procedimientos. De hecho, las caveolas se pueden definir como *rafts* con la proteína caveolina.

La Caveolina/VIP21 fue la primera proteína integral de membrana identificada en las vesículas derivadas del trans-Golgi mediadoras del transporte vesicular exocítico ⁽¹⁵⁵⁾. Homooligómeros de caveolina-1 son responsables de la clasificación y empaquetamiento de proteínas ancladas a GPI, mientras que heterooligómeros de caveolina 1/2 median la clasificación vesicular hacia la membrana basolateral ⁽¹⁵⁶⁾. En

el modelo de ratón para la caveolina 1, la ausencia de caveolas altera la señalización del óxido nítrico y el calcio en el sistema cardiovascular y provoca un engrosamiento del septo alveolar en pulmones (provocada por una proliferación intracelular incontrolada y fibrosis) ⁽¹⁵⁷⁾. Además, el ratón deficiente en caveolina muestra a nivel renal una alteración de la distribución de la uromodulina en TAL, detectándose una retención intracelular vesicular de la proteína ⁽¹⁵⁸⁾, estudios posteriores ponen de evidencia la exclusión de la caveolina-1 como maquinaria principal del transporte apical, y por ello como gen candidato.

4.1.1.3. Proteínas de la familia MAL

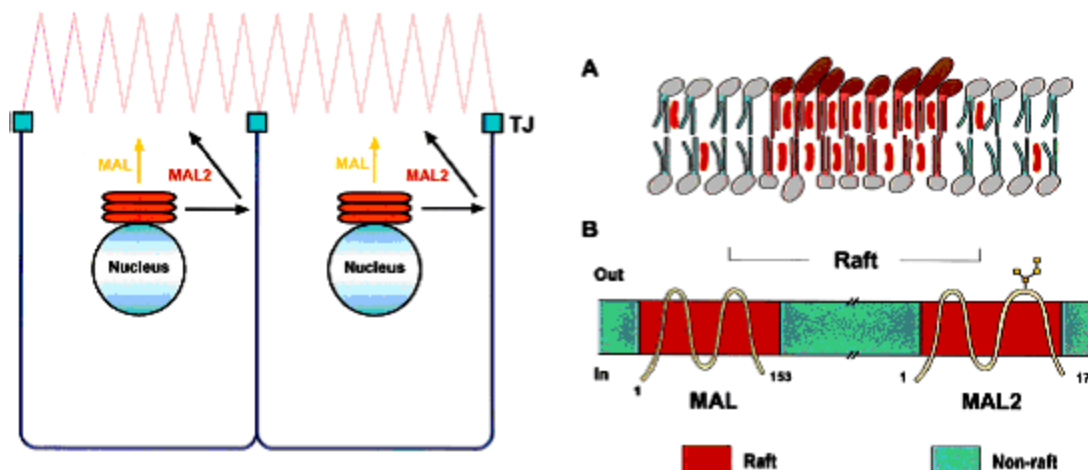
Las proteínas de la familia MAL, siendo MAL el primer proteolípido identificado ⁽¹⁵⁶⁾, juegan un papel importante en el transporte apical de proteínas GPI y diversas proteínas transmembrana, donde MAL y MAL2 son los péptidos mejor caracterizados dentro de esta familia.

El gen MAL codifica para una proteína integral de membrana de 17 kD conocida como MAL, que selectivamente reside en los microdominios de membrana ricos en colesterol de todos los tipos celulares en los que se expresa ^(160, 161, 162).

Se sabe que juega un papel importante en la maquinaria implicada tanto en el transporte directo como en el transcitótico hacia la membrana apical de células polarizadas desde el compartimiento trans-Golgi, pudiendo regular los niveles de receptores de membrana presentes.

El gen MAL2 es otro gen que codifica para otro miembro de la familia de proteínas MAL, la proteína MAL2 ⁽¹⁶³⁾ elemento fundamental de la ruta transcitótica desde la membrana basolateral a la membrana apical en células de hepatoma HepG2 ⁽¹⁶⁴⁾. Ambas proteínas funcionan indistintamente en el transporte y en el mismo tipo celular.

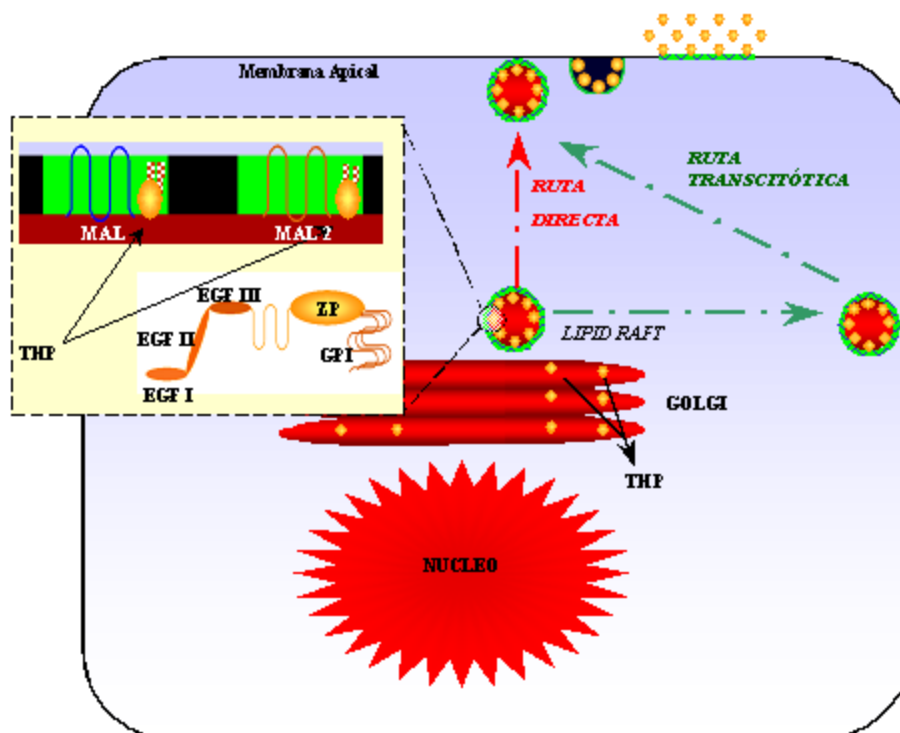
Figura 4.4. Rutas de transporte apical en células polarizadas. MAL interviene en el transporte directo hacia la membrana apical mientras que MAL2 media la ruta indirecta. A. Estructura de una balsa lipídica. B. Estructura de las proteínas MAL y MAL2 en la balsas lipídicas (Foto extraída de Marazuela M y Alonso MA, *Histol Histopathol* (2004) 19:925-933).



Niveles reducidos de MAL y MAL2 provocan una retención intracelular de proteínas que tienen como destino la membrana apical de células MDCK y células Fischer de tiroides de rata ^(165- 168). El patrón de expresión depende del tipo de tejido y del tipo celular. En tejido renal sano MAL se expresa en túbulo contorneado distal, túbulo colector y asa de Henle, mientras que MAL2 se detecta en el túbulo contorneado distal, glomérulo y Henle, siendo el túbulo contorneado proximal negativo para la expresión de ambas proteínas ^(169, 170).

El hecho de que la uromodulina y MAL y MAL2 muestren una misma localización hace pensar que podría existir una posible interacción de ambas proteínas con la uromodulina, además se ha podido comprobar que cuando MAL se encuentra sobreexpresado en un modelo de ratón éste desarrolla entre otras manifestaciones, quistes renales ⁽¹⁷¹⁾. La sobreexpresión de MAL en los riñones provoca una progresiva formación quística en los túbulos distales con cierta atrofia de la corteza renal.

Figura 4.5. Hipótesis del transporte de la uromodulina anclada por su dominio GPI hacia la membrana apical mediada por MAL y MAL2.



Todos estos eventos nos han llevado a pensar que los miembros de la familia MAL son buenos candidatos para la enfermedad medular renal quística. La proteína BENE fue excluida del estudio por no manifestar expresión renal ⁽¹⁷²⁾.

La hipótesis barajado consiste en que la uromodulina de nueva síntesis es transportada hacia el Apto de Golgi donde, tras su correcto ensamblaje es transportada hacia la membrana plasmática mediada por MAL o hacia la membrana basolateral y a continuación hacia la superficie apical mediada por MAL2. Bajo la bicapa lipídica se aculan estas balsas lipídicas que se fusionarán con la membrana apical para exponer hacia la luz del túbulo a la uromodulina anclada por su dominio GPI de anclaje, que posteriormente será cortada y liberada al flujo tubular para luego ser excretada en la orina.

4.2 MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1. Selección de la cohorte

En el estudio de secuenciación directa se han incluido al menos un individuo afecto de las 37 familias diagnosticadas como MCKD resumidas en la tabla 3.2 del capítulo anterior. Para los análisis de inmunohistoquímica se han incluido además, 3 individuos con MCKD2 con mutaciones identificadas en el gen UMOD. Se han subdividido así tres grupos distintos:

1. Grupo UMOD. Con mutaciones identificadas en UMOD.
2. Grupo No-UMOD. Todas aquellas familias que no poseen mutación en UMOD.
3. Grupo Control. Casos control sin enfermedad aparente.

4.2.2. Análisis de Inmunohistoquímica

Los ensayos de inmunohistoquímica se han hecho usando secciones de tejido embebido en parafina procedentes de biopsias de 11 individuos, divididos en 4 grupos distintos: el primer grupo, UMOD, de tres pacientes con mutaciones en el gen UMOD (C255Y y Q316P); un segundo grupo con tres pacientes con nefropatía intersticial sin cambios patogénicos en el gen UMOD, grupo No-UMOD; un tercer grupo con dos pacientes afectados con poliquistosis renal autosómica dominante o del adulto en el grupo de Otras Enfermedades Renales y un último bloque con tres secciones de tejido renal sano.

Las secciones de parafina fueron montadas en portas *DAKO ChemMate Capillary Gap Microscope Slides (DAKO A/S BioTek Solutions, USA)*, secados en estufa a 50°C durante 24 horas y sometidos en 4 inmersiones de xilol de 3 minutos cada una.

Se realizó un lavado en etanol absoluto y etanol al 96% con una duración de 30 segundos

Finalmente se rehidrató en un baño de agua destilada.

El revelado antigénico fue realizado por calor en olla a presión durante dos minutos en solución tampón de citrato de sodio con 0,01 mol/L de trisodio citrato.

A continuación se realizó un lavado salino con tampón Tris a pH 7 e incubado con anticuerpo monoclonal IgG1 anti-ratón.

Los anticuerpos anti-MAL y anti-MAL2 fueron cedidos por el *Dr. Miguel Angel Alonso (CBM Severo Ochoa, Madrid)* específicos para la región N-terminal peptídica de MAL y MAL2 y anti-Tamm-Horsfall (*Biomedical Technologies, Stoughton, MA, USA*) y diluidos a concentraciones de 1:200, 1:100 y 1:300 respectivamente.

Tras la incubación con el anticuerpo primario la inmunodetección fue realizada mediante Ig biotinilada anti-ratón seguida de estreptavidina-biotina peroxidasa unida (*LSAB-DAKO, Glostrup, Denmark*) con el cromógeno diaminobenzidina como sustrato.

Todas las inmunotinciones han sido realizadas en un inmuno-analizador automático TechMate 500 (*DAKO*).

4.2.3. Amplificación de los genes MAL y MAL2

Para poder excluir a MAL como proteína implicada en la nefropatía intersticial asociada a uromodulina se ha procedido a la secuenciación del gen MAL (GeneID: 4118) en el grupo No-UMOD constituido por individuos en los que no se detectó mutación en el gen UMOD.

Los cebadores (*Tabla 4.1.*) para la amplificación de los fragmentos fueron diseñados con el programa *Primer3* para incluir los cuatro exones que conforman las distintas isoformas de MAL junto con sus regiones intrónicas adyacentes correspondientes a lugares de *splicing*, regiones 5' y 3'-UTR y unos 1500 nucleótidos upstream al 5'-UTR pertenecientes a la región promotora.

Gen candidato MAL

PCR 1. UTR 5' y Exón 1

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng de ADN genómico y 12 pmol de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C durante 3 minutos y 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización y 70°C durante dos minutos de hibridación y extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

PCR 2. Exón 2

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng de ADN genómico y 12 pmol de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C durante 3 minutos y 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización y 70°C durante dos minutos de hibridación y extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

PCR 3. Exón 3

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng de ADN genómico y 12 pmol de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C durante 3 minutos y 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización y 70°C durante dos minutos de hibridación y extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

PCR 4. Exón 4 y 3'-UTR

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng de ADN genómico y 12 pmol de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C durante 3 minutos y 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización y 70°C durante dos minutos de hibridación y extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Gen candidato MAL2**PCR 1. UTR 5' y Exón 1**

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng ADN genómico y 12 pmol de cada cebador. Esta PCR tiene un elevado contenido en GC al incluir la región promotora y el 5'-UTR, por lo que se necesita adicionar 1 unidad de *Taq* polimerasa especial para regiones con elevado contenido en GC y solución Q para impedir el anillamiento inespecífico. El programa de amplificación fue optimizado con las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos de desnaturalización y 64°C durante 30 segundos de hibridación y 72°C durante un minuto y medio de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C 10 minutos.

PCR 2. Exón 2

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng de ADN genómico y 12 pmol de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C durante 3 minutos y 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización y 70°C durante dos minutos de hibridación y extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

PCR3. Exón 3

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng de ADN genómico y 14 pmol de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C durante 3 minutos y 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 66°C durante 30 segundos de hibridación y 72°C durante 45 segundos de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Tabla 4.1. Parejas de cebadores usados para la amplificación de los genes *MAL* y *MAL2*. T: Tamaño de las PCRs, temperatura de hibridación.

Region	Cebadores		Secuencia cebadores 5'→3	Tª A. (°C)	T (bp)
MAL					
Promotor	F	MAL-P-1F	5'-GGACCCGACACAATGGCACC	66°	1758bp
	R	MALEX1R	5'-GCCTACATCTGACCCCAGTTGG		
Exón 2	F	MALEX2F	5'-AGAGGAAAATGCCTGCCCTG	70°	482bp
	R	MALEX2R	5'-GCCTCTCCTGATTCTGCTGCC		
Exón 3	F	MALEX3F	5'-ACCAGTGTCCCATCCCCAGC	70°	609bp
	R	MALEX3R	5'-TCCCCTCACACATCTGCCCTC		
Exón 4	F	MALEX4F	5'-TGAGAAGCAATGACAGCCCAAG	70°	916bp
	R	MALEX4R	5'-GCTCTGAGAGTGCAGTGGCCTG		
MAL2					
Promotor	F	MAL2-P-1F	5'-GGTGACTAAGAGGTGGGGAGA	64	1777bp
	R	MAL2EX1R	5'-CAACACCTTTCTTTCCTCCACG		
Exón 2	F	MAL2EX2F	5'-ATGGGTTGAAGAAGCGAGTCC	70°	592bp
	R	MAL2EX2R	5'-AAGGCAGCCACACACCACCG		
Exón 3	F	MAL2EX3F	5'-CAGTTGATTTTCGCTTGGGTTC	66°	530bp
	R	MAL2EX3R	5'-ATCATCCACAACACTGGGGGTG		
Exón 4	F	MAL2EX4F	5'-AGGTTCTGATTGCTGGCTTC	66°	799bp
	R	MAL2EX4R	5'-ACTCAGCAACCAAAACAAAAGGG		

PCR4. Exón 4 y 3'-UTR

Las reacciones fueron realizadas para un volumen final de 25 µl con 0.2 mM dNTPs, 1 U de *Taq* polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 ng de ADN genómico y 14 pmol de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95°C durante 3 minutos y 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 66°C durante 30 segundos de hibridación y 72°C durante 45 segundos de extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

4.3. RESULTADOS.

4.3.1. Distribución de la proteína uromodulina en el grupo UMOD vs. No-UMOD

En primer lugar se realizó un ensayo de inmunohistoquímica para poder detectar la ubicación de la uromodulina en pacientes afectados por Nefropatía intersticial del tipo 2 (uromodulina mutada) del grupo definido como *UMOD*, frente a otros pacientes en los donde se pudo comprobar por secuenciación directa, que no existía mutación en el gen *UMOD* en la línea germinal, grupo definido como *No-UMOD*.

En la *Figura 4.6* se puede observar la distribución de la uromodulina en pacientes control frente a la observada para los grupos de *UMOD* y *No-UMOD*. En los tres grupos se puede comprobar la detección de la proteína en la misma porción de la nefrona, con inmunoreactividad en el asa ascendente de Henle. El Túbulo Contorneado Proximal (TCP) y Glomérulo (G) fueron negativos para la tinción con anti-THP (1:300). La diferencia principal entre ambos grupos reside en la ubicación de la proteína a nivel celular.

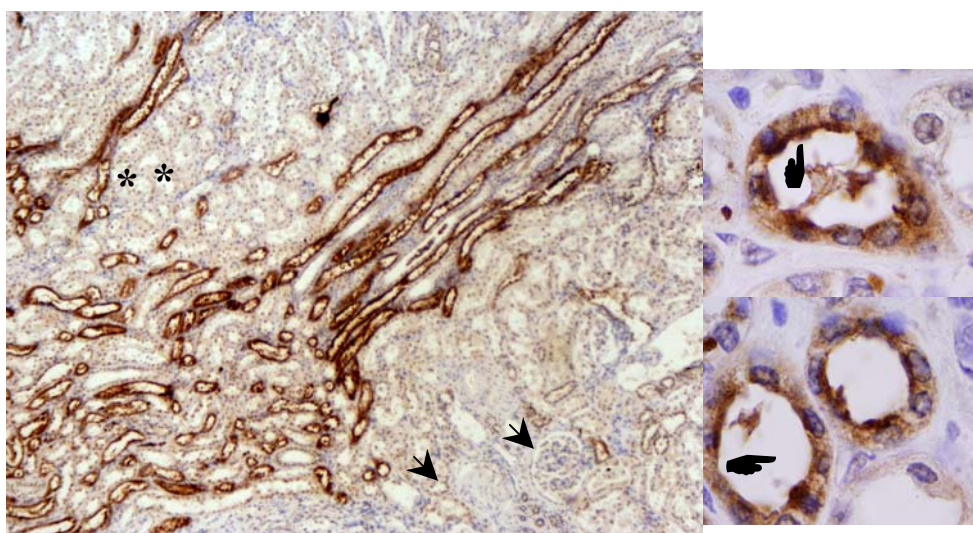


Figura 4.6. Distribución de la uromodulina en riñón sano. Reacción positiva en TAL y túbulos colectores, glomérulos (flecha) y túbulo contorneado proximal (asterisco) negativos (x4). Se puede apreciar la distribución apical de la proteína formando una estructura en forma de anillo que rodea la luz tubular (x40).

En los tres individuos control analizados se pudo comprobar una distribución homogénea, principalmente limitada a la membrana apical *Figura 4.6*, formando una especie de anillo rodeando la luz del túbulo.

En el grupo *UMOD* se puede observar como la estructura en forma de anillo observada en los controles es sustituida por un patrón principalmente citoplasmático, la inmunoreactividad se restringe principalmente a porciones perinucleares *Figura 4.7 c.1*, como el retículo endoplásmico, o dispersa por todo el citoplasma *Figura 4.7 c.2*.

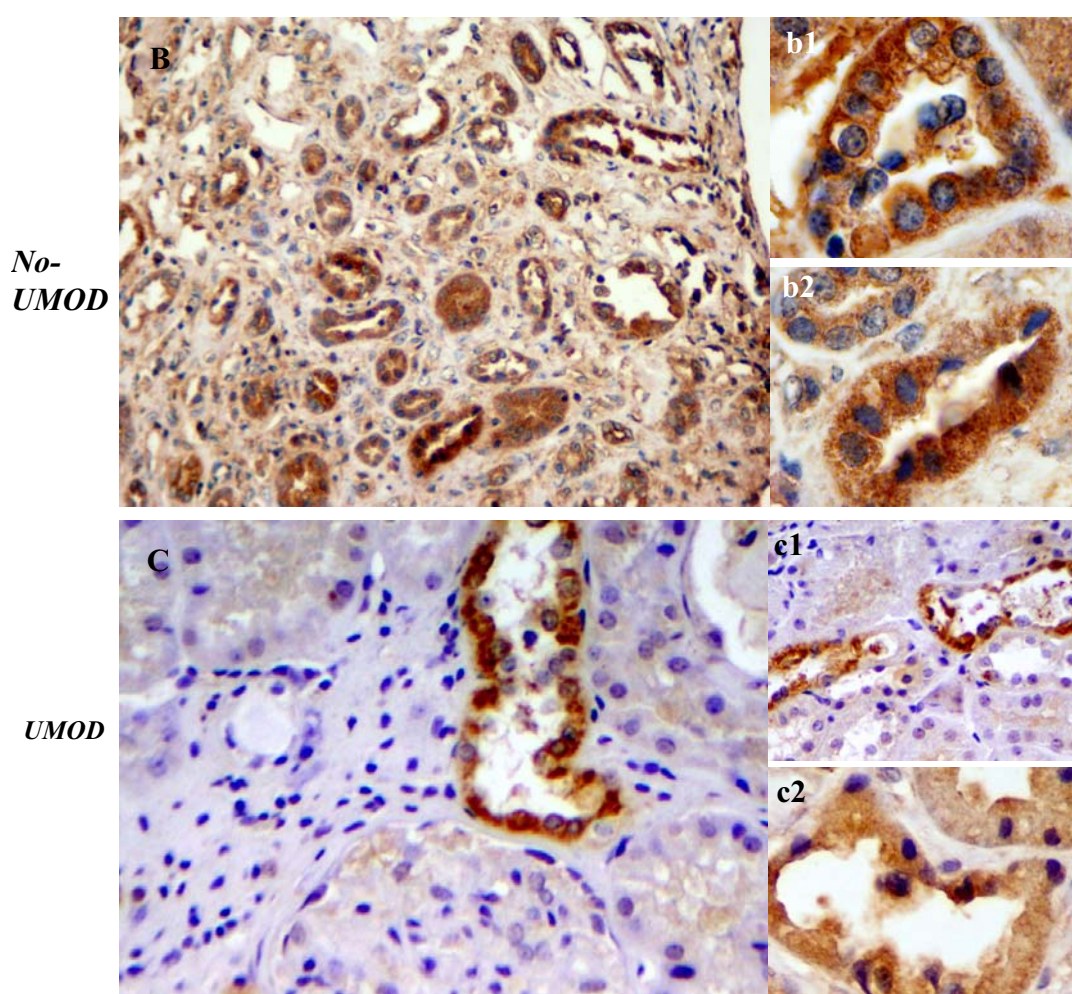


Figura 4.7. Distribución de la uromodulina en los grupos *UMOD* vs *No-UMOD*. B. Distribución de la uromodulina en el grupo *No-UMOD*, en b1 y b2, procedentes de distintos pacientes se puede comprobar la pérdida de apicalidad de la proteína, con inmunoreactividad de Anti-THP dispersa por todo el citoplasma. C. Distribución de la uromodulina en el grupo *UMOD*. c1 y c2. La alteración de la uromodulina provoca un patrón distinto de distribución en función del tipo de mutación.

En cuanto a la ubicación de la uromodulina detectada en el grupo *No-UMOD* *Figura 4.7. B* se aprecia la misma pérdida de localización apical con un patrón predominantemente citoplasmático y disperso, compatible, e ambos casos, con el patrón de retención observado por otros autores.

4.3.2. Distribución de las proteínas MAL y MAL2 en el grupo control

Para localizar la distribución de las proteínas MAL y MAL2 en el riñón se realizó un estudio inmunohistoquímico en secciones de tejido procedentes de riñones sanos con los anticuerpos *anti-MAL 6D9* y *anti-MAL2 9D1*. Los resultados obtenidos fueron los mismos que los descritos en la literatura, excepto para MAL2 en su distribución a nivel del glomérulo. La inmunoreactividad resultó positiva para MAL en el túbulo contorneado distal y colector, con glomérulo y túbulo contorneado proximal negativos, tal y como se esperaba. La diferencia se detectó en la inmunoreactividad de MAL2, que resultó positiva igualmente en túbulo contorneado distal y colector (*Tabla 4.2*) pero negativa en células glomerulares, al igual que en el túbulo contorneado proximal. En cuanto a la distribución en la célula la reactividad contra MAL se centra principalmente bajo la membrana apical, con escasa presencia citoplasmática y una débil reacción a nivel de la membrana basolateral. La apariencia consiste en la formación de pequeñas estructuras redondeadas a modo de vesículas en el borde apical (*Figura 4.8*).

Tabla 4.2. Comparación de la distribución de uromodulina descrita en la literatura frente a la observada en el presente estudio

Expresión	THP		MAL		MAL2	
	Literatura	Resultados	Literatura	Resultados	Literatura	Resultados
Glomérulo	-	-	-	-	+	-
TCP	-	-	-	-	-	-
Asa de Henle Descendente	-	-	-	-	Débil	-
Asa de Henle Ascendente	+	+	+	+	+	+
TCD	+	+	+	+	+	+
Túbulo Colector	+	+	+	+	+	+

La inmunoreactividad detectada en *MAL2* concuerda con la descrita por la literatura excepto a nivel del glomérulo, donde la detección de *MAL2* es aparentemente inexistente (*Tabla 4.2*). En cuanto a la distribución a nivel intracelular, se puede decir que *MAL2* se localiza principalmente bajo la membrana apical, formando una estructura en forma de anillo alrededor de la luz tubular (*Figura 4.8*).

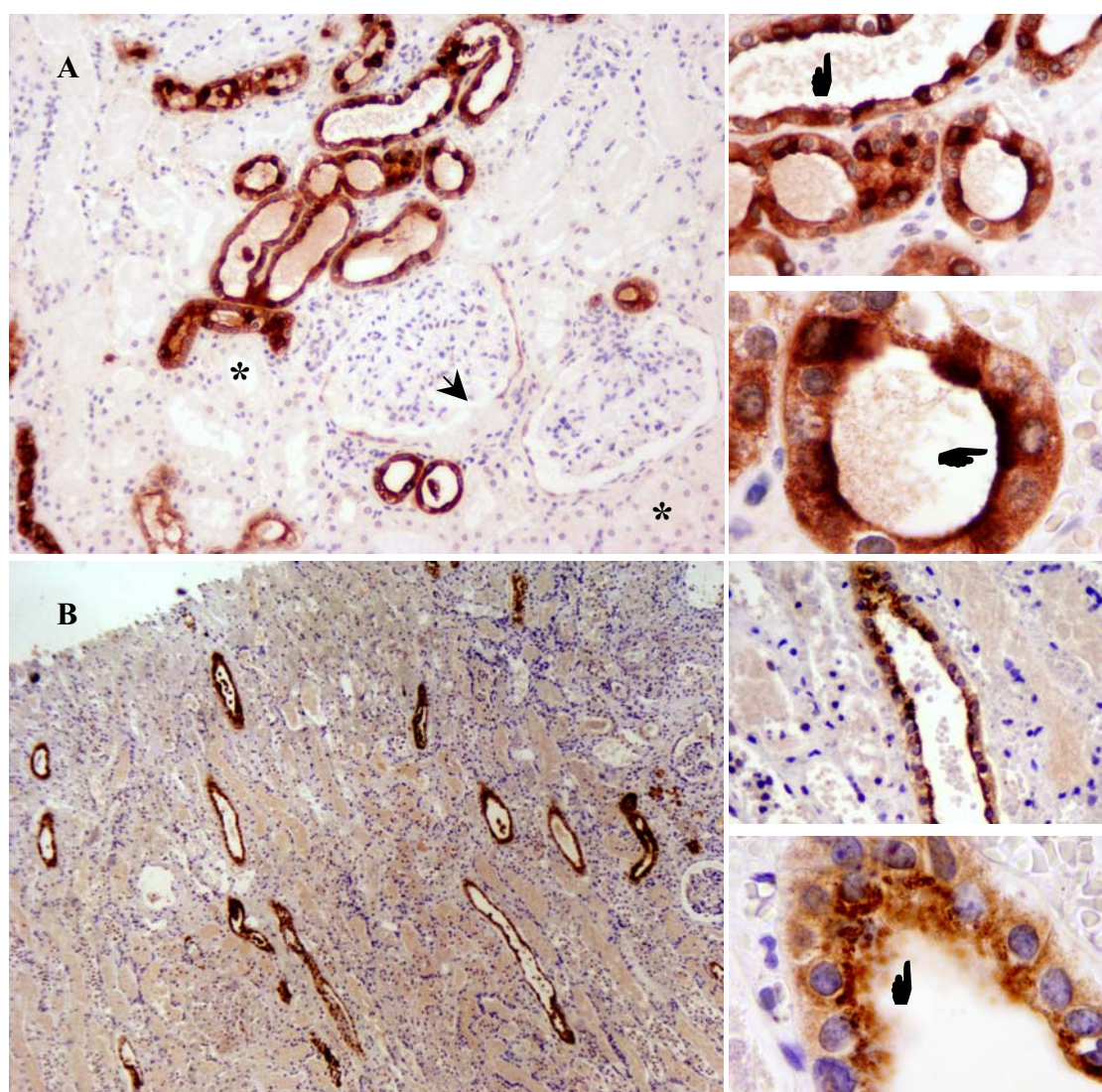


Figura 4.8. Distribución de MAL y MAL2 en el riñón. A. Túbulo contorneado distal y colector positivos para la inmunoreacción de MAL en tejido renal sano, glomérulo y túbulo contorneado proximal sin aparente reacción a MAL. a1 y a2. Localización principalmente bajo la membrana apical formando una especie de anillo que rodea la luz del túbulo. B. Túbulo contorneado distal y colector positivos para la inmunoreacción de MAL2 en tejido renal sano, glomérulo y túbulo contorneado proximal sin aparente reacción a MAL2. b1 y b2. Localización principalmente bajo la membrana apical formando una especie de anillo que rodea la luz del túbulo.

Su presencia en la cara basolateral de la célula es reducida en comparación a la apical y llama la atención la agrupación en estructuras esféricas bajo la membrana apical de mayor tamaño a las observadas en *MAL*.

El hecho de que *MAL*, *MAL2* y *THP* posean la misma distribución a lo largo de la nefrona hace pensar que ambas proteínas transportadoras estén implicadas en el transporte de uromodulina a la membrana apical, por lo que a continuación se procede a estudiar el comportamiento de ambas proteínas en pacientes en los que *UMOD* está mutado en la línea germinal causando alteraciones en el transporte de la proteína hacia la membrana apical.

4.3.3. Distribución de las proteínas MAL y MAL2 en el grupo UMOD vs. No-UMOD

La localización de MAL observada en el grupo No-UMOD es ligeramente distinta a la observada en el grupo control, se pierde el patrón en forma de anillo luminal (*Figura 4.9.*) para dispersarse con mayor intensidad por todo el citoplasma. Este hecho aparenta lógico si consideramos que MAL podría estar transportando a la uromodulina hacia la membrana apical, ya que, al permanecer ésta retenida en el retículo se interrumpe parcialmente el tráfico normal de MAL a la membrana apical. Pero, ¿qué sucede en aquellos pacientes donde existe alteración del transporte de la uromodulina no mutada?.

Tal y como se observa en la *Figura 4.9* la uromodulina permanece retenida igualmente en el interior de la célula aunque en el gen UMOD no existe ninguna mutación a nivel de la línea germinal. MAL, en este grupo, pierde su patrón de distribución normal bajo la bicapa lipídica para aparecer disperso por todo el citoplasma pero con una elevada inmunoreactividad, lo que podría hacer pensar que el gen que codifica para esta proteína podría presentar alguna mutación en su secuencia nucleotídica que impida no sólo el transporte de la uromodulina, sino el de otras proteínas GPI que son transportadas hacia la membrana apical por este mecanismo directo.

Ante estas observaciones se propone realizar un estudio nucleotídico por secuenciación directa del gen MAL que codifica para la proteína MAL en busca de mutaciones responsables de la patogenicidad de la enfermedad.

Pero si el transporte directo de MAL hacia la membrana apical se encuentra alterado, ¿qué sucede con la vía transcitótica o indirecta mediada por MAL2?.

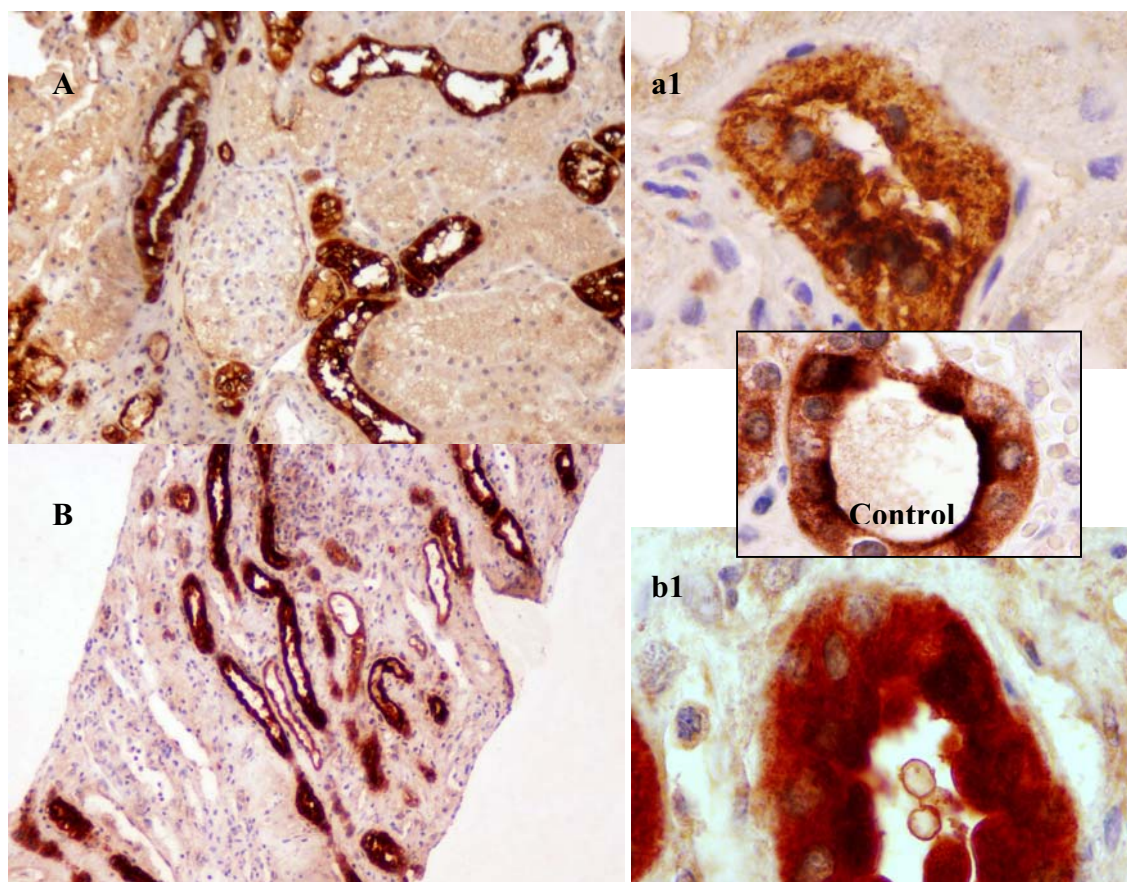


Figura 4.9. Distribución de MAL en el riñón. A. Túbulo contorneado distal y colector positivos para la inmunoreacción de MAL en el grupo UMOD, glomérulo y túbulo contorneado proximal sin aparente reacción a MAL. a1. B. Túbulo contorneado distal y colector positivos para la inmunoreacción de MAL en el grupo No-UMOD, glomérulo y túbulo contorneado proximal sin aparente reacción. b1. inmunoreacción citoplasmática en túbulo contorneado distal.

Al comprobar la localización de MAL2 en los pacientes del grupo UMOD vemos que ésta también ha variado con respecto a los controles, MAL2 se manifiesta fuertemente en estructuras de gran tamaño formando una especie de acúmulos en el interior de la célula, pero alejado de la membrana apical (*Figura 4.10*).

Estos resultados hacen pensar que la uromodulina además de ser transporta por MAL por la ruta directa, va también por la transcitótica o indirecta hacia la membrana

apical y al estar retenida a nivel del retículo endoplásmico por las mutaciones que presenta en los dominios EGF provoca la retención intracelular de MAL2.

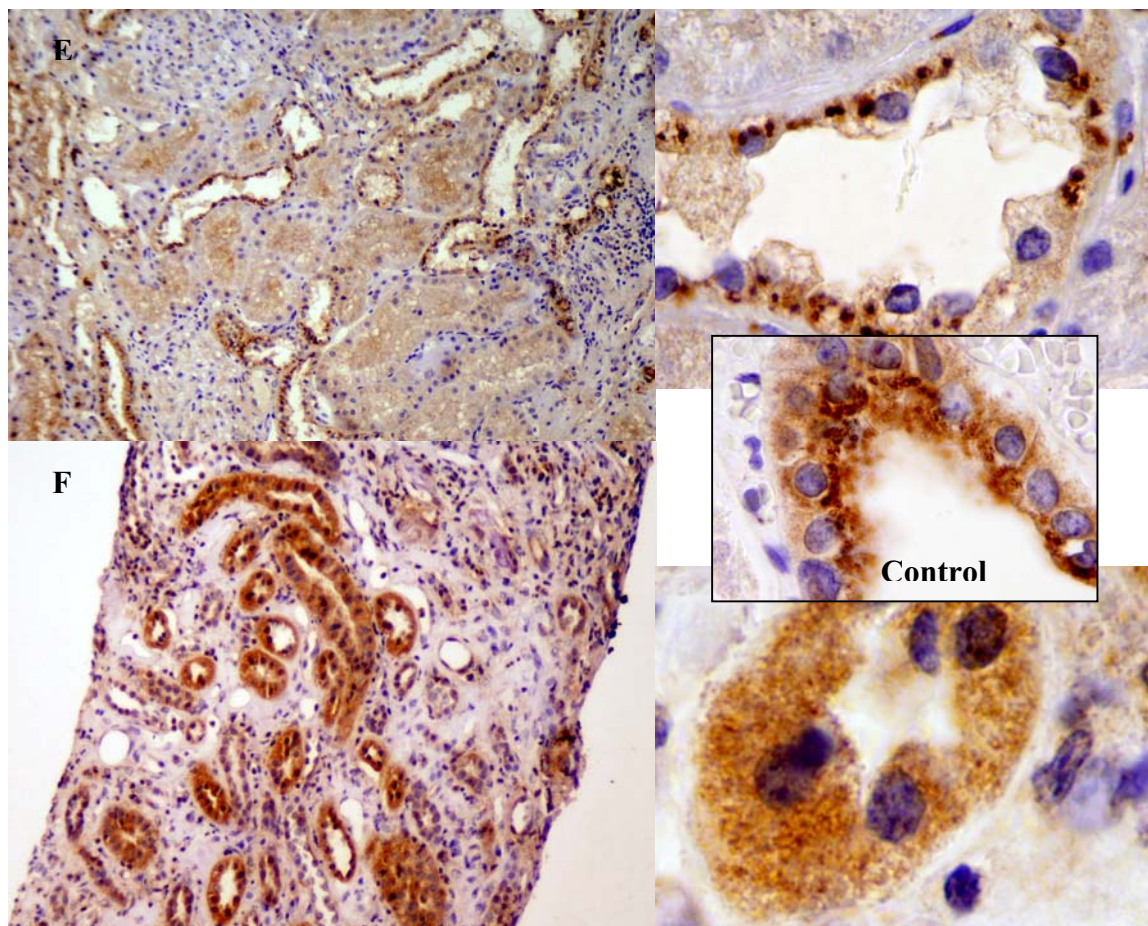


Figura 4.10. Distribución de MAL2 en UMOD vs. No-UMOD. E. Tinción de MAL2 en el grupo UMOD, donde se puede ver un patrón diferente de distribución en el túbulo contorneado distal y colector. F. Elevada reactividad del anticuerpo en el grupo No-UMOD (dilución 1:200), en diversos túbulos se puede apreciar una pseudoestratificación del epitelio con protuberancias apicales hacia la luz del túbulo X40.

Puesto que se ha visto un patrón alterado para ambas proteínas, compatible cualquiera de ellos con la retención de la uromodulina, se propone un estudio genético de MAL y MAL2 como genes candidatos en la búsqueda de mutaciones en su secuencia nucleotídica que puedan explicar esta alteración en la distribución de ambas proteínas y permitiendo así localizar nuevos genes implicados en la Nefropatía Intersticial Autosómica Dominante.

4.3.4. Distribución de MAL y MAL2 en otras enfermedades renales

Los resultados obtenidos para MAL y MAL2 en el grupo No-UMOD muestran una distribución alterada de ambas proteínas que también puede ser entendida no por un efecto directo, sino por un efecto secundario del daño celular provocado por la mutación del gen responsable de la nefropatía intersticial no-UMOD. Para comprobar el efecto de este daño celular se han estudiado pacientes con enfermedades renales distintas y comprobar si la alteración de la distribución de MAL y MAL2 podría usarse como marcador de daño celular, lo que a su vez nos descartaría un papel directo como potenciales candidatos a la enfermedad, aunque para MAL ya se ha visto que en el grupo UMOD aunque una parte aparenta retenida en el interior citoplasmático se puede observar una distribución normal apical, con lo que al menos en este caso, no podría ser explicado por el daño celular.

La poliquistina 1 es una de las proteínas implicadas en la patogenicidad de la poliquistosis renal autosómica dominante (ADPKD), posee 11 dominios transmembrana, que la anclan a la membrana celular, se expresa en membrana apical y basolateral, carece de dominio de anclaje GPI y presenta una gran porción extracelular con diversos dominios PKD-like implicados en adhesión celular. Se expresa a lo largo de toda la nefrona. Puesto que carece de dominio GPI, MAL y MAL2 no median su transporte hacia la membrana apical, por lo que, en el caso de que se observase variación en el patrón de distribución se podría decir que estaría provocado por el daño celular.

En la *Figura 4.11.* vemos la distribución de MAL y MAL2 en tejido renal procedente de un paciente con poliquistosis provocada por la mutación del gen PKD1 c.1068-1074Del7bp; **S286fsX287** que provoca una terminación prematura de cadena de la poliquistina 1 en el aminoácido 287.

MAL y MAL2 se localizan en la zona apical de la célula, como en el tejido normal. Incluso, se puede ver como en el propio quiste MAL2 se distribuye de forma normal, formando estructuras vesiculares de gran tamaño.

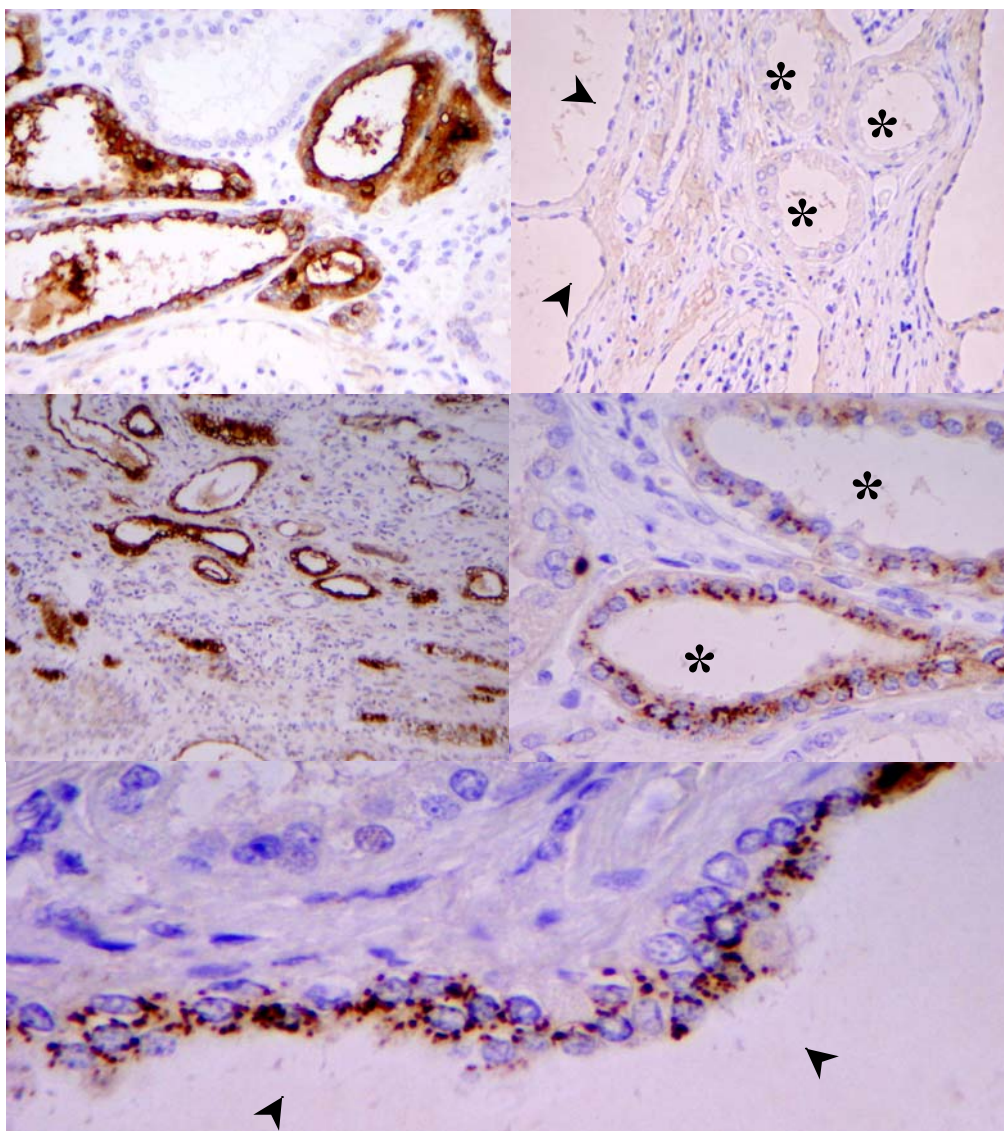


Figura 4.11. Distribución de MAL y MAL2 en tejido renal de un paciente con poliquistosis renal autosómica dominante. A y B distribución de MAL y MAL 2 en otras enfermedades renales poliquísticas. C distribución de MAL2 en un quiste.

A partir de estos datos se puede concluir que MAL y MAL2 están implicados en el transporte de la uromodulina desde el retículo endoplásmico hasta la membrana apical, y tras observar su alteración en tejido con uromodulina normal se decide no excluirlas como posibles candidatos a la Nefropatía Intersticial Autosómica Dominante no ligada a locus 1 y 3. El hecho de que el ratón transgénico de MAL presente un fenotipo renal muy parecido al observado en la enfermedad refuerza nuestra hipótesis de incluirlos como genes candidatos.

4.3.5. Búsqueda de mutaciones en el gen MAL y MAL2

Para investigar el papel que MAL y MAL2 en enfermedades asociadas a uromodulina se han analizado un total de 26 pacientes procedentes de 26 familias en las que no se ha encontrado ninguna alteración nucleotídica patogénica en UMOD. La búsqueda de mutaciones se llevó a cabo en las regiones codificantes de ambos genes (exones), regiones adyacentes implicadas en el splicing y regiones flanqueantes no traducidas a proteína (5' y 3' UTR). Se han detectado una serie de nuevas variantes nucleotídicas clasificadas como polimorfismos en regiones intrónicas y UTRs usando las condiciones descritas en el apartado de material y métodos.

No se ha encontrado ningún cambio a nivel aminoacídico por lo que se descarta a MAL y MAL2 como genes candidatos implicados en la alteración del patrón normal de distribución de la uromodulina al menos en nuestra población.

4.4. DISCUSIÓN

Mediante la estrategia de genes candidatos funcionales se pretende determinar el papel potencial de otros genes que pudiesen estar implicados en la enfermedad renal quística medular en otros loci todavía no identificados. La variabilidad fenotípica en la enfermedad renal quística medular está justificada principalmente por la heterogeneidad genética donde existen al menos 4 loci distintos (3 de ellos ya identificados). La alteración en la excreción de la uromodulina aparenta ser el nexo común entre todas las formas descritas. La uromodulina es una proteína caracterizada por la presencia de 48 residuos de cisteína que forman 24 puentes disulfuro esenciales en la constitución de la estructura terciaria ⁽⁵⁴⁾. Aunque existen otros dominios funcionales a lo largo de la proteína en este capítulo se ha dado mayor importancia al dominio de anclaje GPI, que permite que la uromodulina sea anclada a la membrana apical orientada extracelularmente para posteriormente poder ser cortada y liberada al lumen tubular para ser excretada por el flujo de orina ⁽⁶⁰⁾.

Los cambios en los residuos cisteína de la uromodulina son responsables de su retención a nivel citoplasmático, principalmente en estructuras perinucleares ⁽⁵³⁾, lo que justifica en gran medida sus bajos niveles en la orina de los pacientes ⁽⁵³⁾. Nuestros estudios de inmunohistoquímica confirman estos resultados previamente observados. La alteración de los residuos de cisteína conservados alteran el establecimiento entre los puentes disulfuro de la proteína, cambiando su conformación e impidiendo su correcto plegamiento ^(173, 174), provocando una alteración en su transporte normal de la proteína. Un claro ejemplo de este comportamiento es el observado para la proteína fibrillina-1 en el Síndrome de Marfan, donde se han descrito cambios patogénicos en los residuos Cys de los dominios cbEGF-like ⁽¹⁷⁵⁾.

En nuestra cohorte se ha descrito una mutación en una familia, en un dominio cbEGF pero que no afecta a ninguna cisteína. El patrón de localización observado en la mutación Q316P es distinto al observado por ejemplo en C255Y. Aunque se altera la distribución normal de la proteína la inmunoreactividad citoplasmática es más evidente en el primero que el segundo.

Es lógico pensar que la alteración directa de la proteína provoca una disminución en su excreción, pero ¿cuál es el mecanismo que justifica el mismo comportamiento para la uromodulina no mutada? Probablemente alteraciones de proteínas responsables de su correcto ensamblaje o implicadas en su transporte pueden alterar su destino final. En diversos estudios se ha visto que MAL es una proteína integral de membrana necesaria para el correcto transporte de proteínas GPI en células MCKD, ⁽¹⁶⁵⁾ y alteraciones en estas proteínas provocan una disminución en la expresión de diversas proteínas GPI en la superficie apical celular. Se ha visto mediante el uso de diversos mutantes de MAL que la alteración de la secuencia *L I R W* presente en el extremo carboxi-terminal es fundamental para su correcta incorporación en la bicapa de los lipid rafts ⁽¹⁷⁶⁾, si las proteínas de la familia MAL estuviesen implicadas en el transporte de la uromodulina, alteraciones en su secuencia podrían estar relacionadas con la alteración de su patrón normal de expresión, siendo, este efecto, compatible con la retención de la uromodulina observada.

Se secuenció completamente el gen UMOD en los pacientes incluidos dentro del grupo No-UMOD no habiéndose detectado ningún cambio que cosegregase con la enfermedad. Mediante inmunohistoquímica se comprobó que efectivamente mostraban una retención citoplasmática de la proteína uromodulina en el túbulo contorneado proximal, mientras que en el riñón sano la tinción estaba restringida a la membrana apical, con reactividad aparente en forma de pequeñas vesículas formando una estructura en forma de anillo que rodeaba la luz del túbulo.

Para comprobar si existía alteración en el patrón de distribución normal de MAL y MAL se realizó un ensayo de inmunohistoquímica con anticuerpos frente a ambas proteínas en tres grupos distintos:

- El grupo control, con tejido renal sano mostraba una distribución claramente apical, en forma de anillo en túbulo contorneado proximal, distal y colector
- En el grupo UMOD no se detectó un efecto drástico en la alteración, la tinción aparecía más marcada en las mismas estructuras tubulares, pero la distribución era principalmente apical.
- En el grupo No-UMOD, se pudo comprobar un efecto más acentuado de alteración, puesto que la inmunoreactividad citoplasmática era muy marcada.

Este nuevo patrón de distribución podría deberse a la existencia de mutaciones en MAL o MAL2 que interrumpiesen el transporte de la uromodulina y provocando, por tanto, una nueva forma de nefropatía intersticial autosómica dominante. Otra hipótesis que se barajaba era que, la célula al no ser normal, podía mostrar este patrón pero de forma indirecta, por lo que se decidió valorar el estado de otros tejidos renales afectados por otras enfermedades distintas. Tras el análisis de inmunohistoquímica en pacientes con mutación en el gen PKD1 responsable de la poliquistosis renal autosómica dominante no se pudo detectar alteración en la distribución normal de MAL o MAL2. Por lo que se excluyó que el efecto observado en el grupo No-UMOD pudiese deberse al estado de deterioro celular.

Los resultados obtenidos mediante el estudio de inmunohistoquímica junto con la presencia de quistes renales observados en el ratón modificado genéticamente de MAL ⁽¹⁷¹⁾ nos llevó a considerar a MAL y MAL2 como candidatos de la enfermedad renal quística medular asociada a otros loci.

Se realizó un estudio mutacional de los genes MAL y MAL2 en los 4 exones codificantes, regiones 5' y 3'-UTR y promotores en aquellas familias en las que no mostraban mutación en el gen UMOD o no presentaban ligamiento significativo a ninguno de los loci descritos. Al no identificar ningún cambio nucleotídico que cosegregase con la enfermedad se descartó que los genes MAL y MAL2 fuesen los responsables directos de la enfermedad en nuestra población.

De todas formas la alteración en su patrón de distribución es evidente por lo que se necesitan más estudios funcionales de ambas proteínas que las impliquen en la misma ruta de transporte de la uromodulina.

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

1. En la Enfermedad Renal Quística Medular la existencia de variabilidad fenotípica está justificada principalmente por la existencia de heterogeneidad genética en la que se han identificado 3 loci distintos.
2. La variabilidad fenotípica intrafamiliar observada en las familias analizadas puede deberse a componentes ambientales o genéticos que modulan la manifestación clínica.
3. La identificación de individuos con nefropatía intersticial esporádica asociada a otras manifestaciones como retinitis pigmentosa, retraso mental, hipoacusia neurosensorial bilateral y hepatopatía, característica de la nefronoptosis con edad de debut entre la quinta y sexta década de vida, pone de manifiesto la gran complejidad de un correcto diagnóstico de la enfermedad.
4. La exclusión de familias con ligamiento a los loci 1q21, 16p13 y 1q41 responsables de la Enfermedad Renal Quística Medular tipo 1, 2 y 3 pone de manifiesto la existencia de al menos un cuarto locus implicado todavía no identificado.
5. Mutaciones en el gen UMOD son responsables tan sólo de un 10% de los casos de Enfermedad Renal Quística Medular Autosómica Dominante.
6. El análisis de genes candidatos del locus 1 mediante secuenciación directa revela que los genes EFNA1, EFNA3, APOA1BP, DPM3 y NCU se excluyen como genes candidatos responsables de la Enfermedad Renal Quística Medular tipo 1.
7. La identificación del cambio “*nonssense*” en la familia quince **W769X** en el gen ADAM15 junto con la ausencia de cambios en otras familias con ligamiento al locus 1 ponen de manifiesto dos posibilidades: que ADAM15 no es el gen responsable de la enfermedad en este locus o bien que existe más de un gen responsable de la enfermedad en la región 1q21.
8. El estudio de cosegregación realizado en la familia MCKD47 excluye al gen SCAMP3 como responsable de la enfermedad al menos en nuestra cohorte.

9. La alteración de la distribución de la uromodulina es una característica común a todas las formas de la enfermedad descritas.
10. Las proteínas MAL y MAL2 presentes en las balsas lipídicas y responsables del transporte apical de proteínas glicosilfosfatidilinositol muestran un patrón de localización alterado en pacientes con Enfermedad Renal Quística Medular no ligada al locus 3.
11. Se descartan como genes implicados en la Enfermedad Renal Quística Medular asociada a uromodulina los genes MAL y MAL2 tras su estudio por

VI. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA.

1. **THORN GW, KOEPF GF, CLINTON M. 1944.** *Renal failure simulating adrenocortical insufficiency.* N Engl J Med; 231: 76-85.
2. **SMITH CH, GRAHAM YB. 1945.** *Congenital medullary cystic disease of the kidney with severe refractory anemia.* Am J Dis Child; 69: 369-77
3. **STRAUSS MB. 1962.** *Clinical and pathological aspects of cystic disease of the renal medulla.* Ann Intern Med; 57: 373-81
4. **FANCONI G, HANHART E, VON ALBERTINI A, EUHLINGER R, DOLIVO G, PRADER A. 1951.** *Die familiäre juvenile Nephronophthise.* Helv Paediatr Acta; 6: 1-9
5. **STRAUSS M, SOMMERS S. 1967.** *Medullary cystic disease and familial juvenile nephronophthisis. Clinical and pathological identity.* N Engl J Med; 277: 863-4
6. **HABIB R. 1962.** *Nephronophthisis and medullary cystic disease.* In Strauss J, ed. *Pediatric nephrology. Current concepts and management.* Miami, FL, Symposia Specialist, Vol. 1: 393-401.
7. **GOLDMAN SH, WALKER SR, MERIGAN TC, GARDNER K.D. 1966.** *Hereditary occurrence of cystic disease of the renal medulla.* N Engl J Med; 274: 984-92
8. **GARDNER KD. 1971.** *Evolution of clinical signs in adult-onset cystic disease of the renal medulla.* Ann Intern Med; 74: 47-54
9. **HILDEBRANDT F, WALDHERR R, KUTT R, BRANDIS M. 1992.** *The nephronophthisis complex: clinical and genetic aspects.* Clin Investig; 70: 802-8.
10. **HILDEBRANDT F, OTTO E, RENSING C, NOTHWANG HG, VOLLMER M, ADOLPHS J, HANUSCH H, BRANDIS M. 1997.** *A novel gene encoding an SH3 domain protein is mutated in nephronophthisis type 1.* Nat Genet; 17: 149-53
11. **MONGEAU JG, WORTHEN HG. 1967.** *Nephronophthisis and medullary cystic disease.* Am J Med; 43: 345-55
12. **HILDEBRAND F, OTTO E. 2000.** *Molecular genetics of nephronophthisis and medullary cystic kidney disease.* J Am Soc Nephrol; 11: 1753-61.

13. **KLEINKNECHT C, HABIB R. 1992.** *NEPHRONOPHTHISIS*. IN CAMERON JC, DAVISON AM, GRUNFELD J-P, KERR KNS, RITZ E, eds. Textbook of clinical nephrology. Oxford: Oxford University Press; 2188-97.
14. **THOMPSON GR, WESS JJ, GOLDMAN RT, RIGG GA. 1978.** *Familial occurrence of hyperuricemia, gout, and medullary cystic disease*. Arch. Intern. Med. **138**:1614-1617.
15. **BURKE JR, INGLIS JA, CRASWELL PW, MITCHELL KR, EMMERSON BT. 1982.** *Juvenile nephronophthisis and medullary cystic disease--the same disease (report of a large family with medullary cystic disease associated with gout and epilepsy)*. Clin Nephrol. Jul;18(1):1-8.
16. **SCOLARI F, GHIGGERI GM, CASARI G, AMOROSO A, PUZZER D, CARIDI GL, VALZORIO B, TARDANICO R, VIZZARDI V, SAVOLDI S, VIOLA BF, BOSSINI N, PRATI E, GUSMANO R, MAIORCA R. 1998.** *Autosomal dominant medullary Cystic Disease: a disorder with variable clinical pictures and absence of linkage with the NPH1 locus*. Nephrol Dial Transplant; 13: 2536-46
17. **SCOLARI F, VIOLA BF, PRATI E, GHIGGERI GM, CARIDI G, AMOROSO A, CASARI G, MAIORCA R. IN REMUZZI G, SESSA A. 2001.** *Rare kidney disease. Medullary cystic kidney disease: Past and present*. Contrib Nephrol; 136: 68-78.
18. **DAHAN KS, FUCHSHUBER A, ADAMIS S, SMAERS M, KROISS S, LOUTE G, COSYNS GP, HILDEBRANDT F, VERELLEN-DUMOULIN C, PIRSON Y. 2001.** *Familial juvenile hyperuricemic nephropathy and autosomal dominant medullary cystic kidney disease type 2: Two facets of the same disease?* J Am Soc Nephrol; 12: 2348-57.
19. **STAVROU C, PIERIDES A, ZOUVANI I, KYRIACOU K, ANTIGNAC C, NEOPHYTOU P, CHRISTODOULOU K, DELTAS CC. 1998.** *Medullary cystic kidney disease with hyperuricemia and gout in a large Cypriot family: No allelism with nephronophthisis type 1*. Am J Med Genet; 77: 149-54.
20. **ANTIGNAC C, ARDUY CH, BECKMANN JS, BENESSY F, GROS F, MEDHIOUB M, HILDEBRANDT F, DUFIER JL, KLEINKNECHT C, BROYER M, ET AL. 1993.** *A gene for familial juvenile nephronophthisis (recessive medullary cystic kidney disease) maps to chromosome 2p*. Nat Genet. Apr;3(4):342-5.

21. **KONRAD M**, SAUNIER S, HEIDET L, SILBERMANN F, BENESSY F, CALADO J, LE PASLIER D, BROYER M, GUBLER MC, ANTIGNAC C. **1996**. *Large homozygous deletions of the 2q13 region are a major cause of juvenile nephronophthisis*. Hum Mol Genet. Mar;5(3):367-71.
22. **HAIDER NB**, CARMI R, SHALEV H, SHEFFIELD VC, LANDAU D. **1998**. *A Bedouin kindred with infantile nephronophthisis demonstrates linkage to chromosome 9 by homozygosity mapping*. Am J Hum Genet. Nov;63(5):1404-10.
23. **OMRAN H**, FERNANDEZ C, JUNG M, HAFFNER K, FARGIER B, VILLAQUIRAN A, WALDHERR R, GRETZ N, BRANDIS M, RUSCHENDORF F, REIS A, HILDEBRANDT F. **2000**. *Identification of a new gene locus for adolescent nephronophthisis, on chromosome 3q22 in a large Venezuelan pedigree*. Am J Hum Genet; Jan;66(1):118-27.
24. **SCHUERMANN MJ**, OTTO E, BECKER A, SAAR K, RUSCHENDORF F, POLAK BC, ALA-MELLO S, HOEFELE J, WIEDENSOHLER A, HALLER M, OMRAN H, NURNBERG P, HILDEBRANDT F. **2002**. *Mapping of gene loci for nephronophthisis type 4 and Senior-Loken syndrome, to chromosome 1p36*. Am J Hum Genet. May;70(5):1240-6.
25. **OTTO E**, HOEFELE J, RUF R, MUELLER AM, HILLER KS, WOLF MT, SCHUERMANN MJ, BECKER A, BIRKENHAGER R, SUDBRAK R, HENNIES HC, NURNBERG P, HILDEBRANDT F. **2002**. *A gene mutated in nephronophthisis and retinitis pigmentosa encodes a novel protein, nephroretinin, conserved in evolution*. Am J Hum Genet. Nov;71(5):1161-7.
26. **MOLLET G**, SALOMON R, GRIBOUVAL O, SILBERMANN F, BACQ D, LANDTHALER G, MILFORD D, NAYIR A, RIZZONI G, ANTIGNAC C, SAUNIER S. **2002**. *The gene mutated in juvenile nephronophthisis type 4 encodes a novel protein that interacts with nephrocystin*. Nat Genet. Oct;32(2):300-5. Erratum in: Nat Genet 2002 Nov;32(3):459.
27. **CHRISTODOULOU K**, TSINGIS M, STAVROU C, ELEFThERIOU A, PAPAPAVLOU P, PATSALIS PC, IOANNOU P, PIERIDES A, CONSTANTINOUD DELTAS C. **1998**. *Chromosome 1 localization of a gene for autosomal dominant medullary cystic kidney disease*. Hum Mol Genet. May;7(5):905-11.

28. **GYAPAY G**, MORISSETTE J, VIGNAL A, DIB C, FIZAMES C, MILLASSEAU P, MARC S, BERNARDI G, LATHROP M, WEISSENBAACH J. **1994**. *The 1993-94 Genethon human genetic linkage map*. Nat Genet; Jun;7(2 Spec No): 246-339.
29. **DIB C**, FAURE S, FIZAMES C, SAMSON D, DROUOT N, VIGNAL A, MILLASSEAU P, MARC S, HAZAN J, SEBOUN E, LATHROP M, GYAPAY G, MORISSETTE J, WEISSENBAACH J. **1996**. *A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites*. Nature; Mar 14;380(6570):152-4.
30. **SCOLARI, D**, PUZZER, A AMOROSO, G CARIDI, G M GHIGGERI, R MAIORCA, P ARIDON, M DE FUSCO, A BALLABIO, AND G CASARI. *Identification of a new locus for medullary cystic disease, on chromosome 16p12*. Am J Hum Genet. 1999 June; 64(6): 1655–1660.
31. **HODANOVA K**, MAJEWSKI J, KUBLOVA M, VYLETAL P, KALBACOVA M, STIBURKOVA B, HULKOVA H, CHAGNON YC, LANOUELETTE CM, MARINAKI A, FRYNS JP, VENKAT-RAMAN G, KMOCH S. **2005**. Mapping of a new candidate locus for uromodulin-associated kidney disease (UAKD) to chromosome 1q41. Kidney Int. Oct;68(4):1472-82.
32. **MULLIS, KB**, FALOONA F, SCHARF S, SAIKI R, HORN G, ERLICH H. **1986**. *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring. Harb. Symp.Quant.Biol. 51: 263-273
33. **KWOK, P**, DENG Q, ZAKERI H, NICKERSON DA. **1996**. *Increasing the information content of STS based genome maps: Identifying polymorphism in mapped STSs*. Genomics. 23: 138-144
34. **JEFFREYS, AJ**, WILSON V, THEIN SL. **1985**. *Hypervariable <minisatelite> regions in human DNA*. Nature. 314: 67-73.
35. **GOLDSTEIN, BD**, SCHLOTTERER C. **1999**. *Microsatellites evolution and applications*. Oxford University Press, New York, 352pp
36. **BOTSTEIN, D**, WHITE RL, SKOLNICK M, DAVIS RW. **1980**. *Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms*. American Journal of Human Genetics. 32: 314-331

37. **VANCE, JF, OTHMANE KM. 1998.** *Methods of Genotyping*. In: HAINES, J.L., PERICAK-VANCE, M.A. eds. *Approaches to gene mapping in complex human diseases*. A John Wiley & Son, Inc., Publication. NY. pp 213-228
38. **ARMOUR, JA, NEUMANN, R, GOBERT S, JEFFREYS AJ. 1994.** *Isolation of human simple repeat loci by hybridisation selection*. Human Molecular Genetics. 3: 599-605
39. **HANCOCK, J. 1999.** *Microsatellites and other simple sequence: genomic context and mutational mechanisms*. Goldstein D., Schlotterer C. (eds.). *Microsatellites evolution and applications*, Oxford University Press, New York, pp. 1-10
40. **TAUTZ, D, SCHLOTTERER C. 1994.** *Simple sequences. Current Opinion in Genetics and Development*. 4: 832-837
41. **LITT, M, LUTY JA. 1989.** *A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene*. American Journal of Human Genetics. 44: 397-401
42. **TAUTZ, D. 1989.** *Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphism markers*. Nucleic Acids Research. 12: 4127-4138.
43. **WEBER, JL, MAY PE. 1989.** *Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction*. Am. J. Hum. Genet. 44: 388-396.
44. **CHRISTODOULOU K, TSINGIS M, STAVROU C ET AL. 1998.** *Chromosome 1 localization of a gene for medullary cystic kidney disease*. Hum Mol Genet; 7: 905-911.
45. **COHN DH, SHOHAT T, YAHAV M, ILAN T, RECHAVI G, KING L, SHOHAT M. 2000.** *A locus for an autosomal dominant form of progressive renal failure and hypertension at chromosome 1q21*. Am J Hum Genet; 67(3): 647-51.
46. **AURANEN M, ALA-MELLO S, TURUNEN JA, JARVELA I. 2001.** *Further evidence for linkage of autosomal-dominant medullary cystic kidney disease on chromosome 1q21*. Kidney Int; 60(4): 1225-32.
47. **MAACK T, CAMARGO MJ, KLEINERT HD, LARAGH JH, ATLAS SA. 1985.** *Atrial natriuretic factor: structure and functional properties*. Kidney Int. Apr;27(4):607-15.

48. **KOPTIDES M**, MEAN R, STAVROU C, PIERIDES A, DEMETRIOU K, NAKAYAMA T, HILDEBRANDT F, FUCHSHUBER A, DELTAS CC. **2001**. *Novel NPR1 polymorphic variants and its exclusion as a candidate gene for medullary cystic kidney disease (ADMCKD) type 1*. Mol Cell Probes. Dec;15(6):357-61.
49. **FUCHSHUBER A**, KROISS S, KARLE S, BERTHOLD S, HUCK K, BURTON C, RAHMAN N, KOPTIDES M, DELTAS C, OTTO E, RUSCHENDORF F, FEEST T, HILDEBRANDT F. **2001**. *Refinement of the gene locus for autosomal dominant medullary cystic kidney disease type 1 (MCKD1) and construction of a physical and partial transcriptional map of the region*. Genomics. Mar 15;72(3):278-84.
50. **KLEIN C**, GRUDZIEN M, APPASWAMY G, GERMESHAUSEN M, SANDROCK I, SCHAFFER AA, RATHINAM C, BOZTUG K, SCHWINZER B, REZAEI N, BOHN G, MELIN M, CARLSSON G, FADEEL B, DAHL N, PALMBLAD J, HENTER JI, ZEIDLER C, GRIMBACHER B, WELTE K. **2007**. *HAX1 deficiency causes autosomal recessive severe congenital neutropenia (Kostmann disease)*. Nature Genet. 39: 86-92
51. **HART TC**, GORRY MC, HART PS, WOODARD AS, SHIHABI Z, SANDHU J, SHIRTS B, XU L, ZHU H, BARMADA MM, BLEYER AJ. **2002**. *Mutations of the UMOD gene are responsible for medullary cystic kidney disease 2 and familial juvenile hyperuricaemic nephropathy*. J. Med. Genet. 39: 882-892.
52. **TURNER JJO**, STACEY JM, HARDING B, KOTANKO P, LHOTTA K, PUIG JG, ROBERTS I, TORRES RJ, THAKKER RV. **2003**. *UROMODULIN mutations cause familial juvenile hyperuricemic nephropathy*. J. Clin. Endocr. Metab. 88: 1398-1401.
53. **RAMPOLDI L**, CARIDI G, SANTON D, BOARETTO F, BERNASCONI I, LAMORTE G, TARDANICO R, DAGNINO M, COLUSSI G, SCOLARI F, GHIGGERI GM, AMOROSO A, CASARI G. **2003**. *Allelism of MCKD, FJHN and GCKD caused by impairment of uromodulin export dynamics*. Hum Mol Genet; 15;12(24):3369-84

54. **SUDHOF TC**, RUSSELL DW, GOLDSTEIN JL, BROWN MS, SANCHEZ-PESCADOR R, BELL GI. **1985**. *Cassette of eight exons shared by genes for LDL receptor and EGF precursor*. Science. May 17;228(4701):893-5.
55. **HESSION C**, DECKER JM, SHERBLOM AP, KUMAR S, YUE CC, MATTALIANO RJ, TIZARD R, KAWASHIMA E, SCHMEISSNER U, HELETKY S, ET AL. **1987**. *Uromodulin (Tamm-Horsfall glycoprotein): a renal ligand for lymphokines*. Science. Sep 18;237(4821):1479-84.
56. **JOVINE L**, QI H, WILLIAMS Z, LITSCHER E, WASSARMAN PM. **2002**. *The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins*. Nat Cell Biol. Jun;4(6):457-61.
57. **RINDLER MJ**, NAIK SS, LI N, HOOPS TC, PERALDI MN. **1990**. *Uromodulin (Tamm-Horsfall glycoprotein/uromucoid) is a phosphatidylinositol-linked membrane protein*. J Biol Chem. Dec 5;265(34):20784-9.
58. **LAWLER J**, WEINSTEIN R, HYNES RO. **1988**. *Cell attachment to thrombospondin: the role of ARG-GLY-ASP, calcium, and integrin receptors*. J Cell Biol. Dec;107(6 Pt 1):2351-61.
59. **RUOSLAHTI E**, PIERSCHBACHER MD. **1987**. *New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins*. Science. Oct 23;238(4826):491-7
60. **CAVALLONE D**, MALAGOLINI N, SERAFINI-CESSI F; FUKUOKA S, KOBAYASHI K. **2001**. *Mechanism of release of urinary Tamm-Horsfall glycoprotein from the kidney GPI-anchored counterpart*. Biochem Biophys Res Commun. Jan 12;280(1):110-4;
61. **FUKUOKA S**, KOBAYASHI K. **2001**. *Analysis of the C-terminal structure of urinary Tamm-Horsfall protein reveals that the release of the glycosyl phosphatidylinositol-anchored counterpart from the kidney occurs by phenylalanine-specific proteolysis*. Biochem Biophys Res Commun. Dec 21;289(5):1044-8.
62. **STEVENSON FK**, CLEAVE AJ, KENT PW. **1971**. *The effect of ions on the Viscometric and ultracentrifugal behaviour of Tamm-Horsfall glycoprotein*. Biochim Biophys Acta.; Apr 27;236(1):59-66.
63. **CLYNE DH**, KANT KS, PESCE AJ, POLLAK VE. **1979**. *Nephrotoxicity of low molecular weight serum proteins: physicochemical interactions between myoglobin,*

- hemoglobin, bence-jones proteins and tamm-horsfall mucoprotein. Curr Probl Clin Biochem; (9): 299-308.*
64. **SCHWARTZ RH**, BERDON WE, WAGNER J, BECKER J, BAKER DH. **1970.** *Tamm-Horsfall urinary mucoprotein precipitation by urographic contrast agents: in vitro studies. Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med. Apr;108(4):698-701.*
65. **DAWSON P**, FREEDMAN DB, HOWELL MJ, HINE AL. **1984.** *Contrast-medium-induced acute renal failure and Tamm-Horsfall proteinuria. Br J Radiol. Jul; 57(679): 577-9.*
66. **DAWNAY AB**, THORNLEY C, NOCKLER I, WEBB JA, CATTELL WR. **1985.** *Tamm-Horsfall glycoprotein excretion and aggregation during intravenous urography. Relevance to acute renal failure. Invest Radiol. Jan-Feb;20(1):53-7.*
67. **KUMAR S**, MUCHMORE A. **1990.** *Tamm-Horsfall protein--uromodulin (1950-1990). Kidney Int; Jun;37(6):1395-401.*
68. **ORSKOV I**, FERENCZ A, ORSKOV F. **1980.** *Tamm-Horsfall protein or uromucoid is the normal urinary slime that traps type 1 fimbriated Escherichia coli. Lancet. Apr 19;1(8173):887.*
69. **KURIYAMA SM**, SILVERBLATT FJ. **1986.** *Effect of Tamm-Horsfall urinary glycoprotein on phagocytosis and killing of type I-fimbriated Escherichia coli. Infect Immun; Jan;51(1):193-8.*
70. **MUCHMORE AV**, DECKER JM. **1986.** *Uromodulin. An immunosuppressive 85-kilodalton glycoprotein isolated from human pregnancy urine is a high affinity ligand for recombinant interleukin 1 alpha. J Biol Chem; Oct 15;261(29):13404-7.*
71. **SHERBLOM AP**, DECKER JM, MUCHMORE AV. **1988.** *The lectin-like interaction between recombinant tumor necrosis factor and uromodulin. J Biol Chem. Apr 15;263(11):5418-24.*
72. **WILCOX WD.** **1996.** *Abnormal serum uric acid levels in children. J Pediatr; 128(6): 731-41.*
73. **SENIOR B**, FRIEDMANN AI, BRANDO JL. **1961.** *Juvenile familial nephropathy with tapeto-retinal degeneration. Am J Ophthal; 52: 625-33.*
74. **LOKEN AC**, HANSSEN O, HALVORSEN S, JOLSTER NJ. **1961.** *Hereditary renal dysplasia and blindness. Acta Pediatr Scand; 50:-177-84.*

75. **FILLASTRE YP**, GENERAL J, RIBERI P, MARX P, WHITWORTH JA, KUNH JM. **1976**. *Senior-Loken syndrome (nephronophthisis and tapeto-retinal degeneration): a study of 8 cases from 5 families*. Clin Nephrol; 5:14-9.
76. **EGGER J**, LAKE BD, WILSON J. **1981**. *Mitochondrial cytopathy. A multisystem disorder with ragged red fibres are muscle biopsy*. Arch Dis Child, 56: 741-52.
77. **MAINZER F**, SALDINO RM, OZONOFF MB, MINAGI H. **1970**. *Familial nephropathy associated with retinitis pigmentosa, cerebellar ataxia and skeletal abnormalities*. Am J Med; 49: 556-62.
78. **GIEDION A**. **1979**. *Phalangese conx shaped epiphysis of the hands (PhCSEH) and chronic renal disease. The conorenal syndromes*. Pediatric Radiol; 8: 32-8.
79. **DONALDSON MDC**, WARNER AA, TROMPETER RS, HAYCOCK GB, CHANTLER C. **1985**. *Familiae juvenile nephronophthisis, Jeune's syndrome and associated disorders*. Arch Dis Child; 60: 426-34.
80. **CHURCHILL DN**, MC MANAMON P, HURLEY RM. **1981**. *Renal disease-a sixth cardinal feature of the Laurence-Moon-Bield syndrome*. Clin Nephrol; 16: 151-4.
81. **HURLEY RM**, DERY P, NOGRADY MB, DRUMMOND KN. **1975**. *The renal lesion of the Laurence-Moon-Bield Syndrome*. J Pediatr; 87: 206-9.
82. **BOICHIS H**, PASSWELL J, DAVID R, MILLER H. **1973**. *Congenital hepatic fibrosis and nephronophthisis*. Q J Med; 42: 221.
83. **BODAGHI E**, ZAMAN T, KHERADPIR MH. **1980**. *Familial nephropathy, with congenital liver fibrosis, degenerative retinitis and cone-shaped epiphysis*. Int. J Pediatr Nephrol; 1: 153-6.
84. **DELANEY V**, MULLANEY J, BOURKE E. **1978**. *Juvenile nephronophthisis, congenital hepatic fibrosis and retinal hypoplasia in twins*. Q J Med; 186: 281-90.
85. **PROESMAN W**, VAN DAMME B, MACKEN J. **1975**. *Nephronophthisis and tapetoretinal degeneration associated with liver fibrosis*. Clin Nephrol; 3:160-4.
86. **FERNANDEZ-RODRIGUEZ R**, MORALES JM, MARTINEZ R, ET AL. **1990**. *Senior-Loken Syndrome (nephronophthisis and pigmentary retinopathy) associated to liver fibrosis: a family study*. Nephron; 55: 74-7.

87. **POPOVIC-ROLOVIC M**, ET AL. **1976**. *Juvenile nephronophthisis associated with retinal pigmentary dystrophy, cerebellar ataxia, and skeletal abnormalities*. Arch Dis Child. Oct; 51(10): 801-3.
88. **WALDHERR R**, LENNERT T, WEBER HP, FODISH HJ, SCHÄRER K. **1982**. *The nephronophthisis complex. A clinicopathologic study in children*. Virchows Arch (A); 394: 235-54.
89. **BROYER M**. **1994**. *Incidence and etiology of ESRD in children*. In: Fine RN, Gruskin AB (eds). *End-stage renal disease in children*. Saunders, Philadelphia; 9-15.
90. **RITTER M**, BUECHLER C, BOETTCHER A, BARLAGE S, SCHMITZ-MADRY A, ORSO E, BARED S. M, SCHMIEDEKNECHT G, BAEHR C. H, FRICKER G, SCHMITZ G. **2002**. *Cloning and characterization of a novel apolipoprotein A-I binding protein AI-BP secreted by cells of the kidney proximal tubules in response to HDL or ApoA-I*. Genomics 79: 693-702.
91. **CERRETTI DP**, LYMAN SD, KOZLOSKY CJ, COPELAND NG, GILBERT DJ, JENKINS NA, VALENTINE V, KIRSTEIN MN, SHAPIRO DN, MORRIS SW. **1996**. *The genes encoding the Eph-related receptor tyrosine kinase ligands LERK-1 (EPLG1 Epl1) LERK-3 (EPLG3 Epl3) and LERK-4 (EPLG4 Epl4) are clustered on human chromosome 1 and mouse chromosome 3*. Genomics;33: 277-282.
92. **PASQUALE EB**. 2005. *Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour*. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol;6, 462-475.
93. **DAVIES JA** AND FISHER CE. **2002**. *Genes and proteins in renal development*. Exp. Nephrol.;10, 102-113.
94. **DUFFY SL**, STEINER KA, TAM PP, BOYD AW. **2006**. *Expression analysis of the EphA1 receptor tyrosine kinase and its high-affinity ligands Efna1 and Efna3 during early mouse development*. Gene Expr Patterns. Oct;6(7):719-23.
95. **RAEVAARA TE**, TIMOHARJU T, LONNQVIST KE, KARIOLA R, STEINHOFF M, HOFSTRA RMW, MANGOLD E, VOS YJ, NYSTROM-LAHTI M. **2002**. *Description and functional analysis of a novel in frame mutation linked to hereditary non-polyposis colorectal cancer*. J Med Genet; 39: 747-750.

96. **BENTAHIR M**, NYABI M, VERHAMME J, TOLIA HORRÉ K, WILTFANG J, ESSELMANN H, DE STROOPER B. **2006**. *Presenilin clinical mutations can affect γ -secretase activity by different mechanisms*. Journal of Neurochemistry 96:3 732.
97. **FALQUET L**, PAGNI M, BUCHER P, HULO N, SIGRIST CJ, HOFMANN K & BAIROCH A. **2002**. *The PROSITE database, its status in 2002*. Nucleic Acids Res. 30:235-238.
98. **KURYSHEV VY**, VOROBYOV E, ZINK D, SCHMITZ J, ROZHDESTVENSKY TS, MUNSTERMANN E, ERNST U, WELLENREUTHER R, MOOSMAYER P, BECHTEL S, SCHUPP I, HORST J, KORN B, POUSTKA A, WIEMANN S. **2006**. *An anthropoid-specific segmental duplication on human chromosome 1q22*. Genomics. Aug;88(2):143-51
99. **WOLF MT**, MUCHA BE, HENNIES HC, ATTANASIO M, PANTHER F, ZALEWSKI I, KARLE SM, OTTO EA, DELTAS CC, FUCHSHUBER A, HILDEBRANDT F. **2006**. *Medullary cystic kidney disease type 1: mutational analysis in 37 genes based on haplotype sharing*. Hum Genet. Jul;119(6):649-58
100. **FRYDMAN J**, NIMMESGERN E, ERDJUMENT-BROMAGE H, WALL JS, TEMPST P, HARTL FU. **1992**. *Function in protein folding of TriC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and structurally related subunits*. EMBO J. 11:4767-4778
101. **SEVIGNY G**, LEMIEUX N, STEYAERT A, BIBOR-HARDY V. **1996**. *Structure of the gene coding for the mouse TRiC-P5 subunit of the cytosolic chaperonin TriC*. Genomics 31:107-110.
102. **WINFIELD SL**, TAYEBI N, MARTIN BM, GINNS EI, SIDRANSKY E. **1997**. *Identification of three additional genes contiguous to the glucocerebrosidase locus on chromosome 1q21: implications for Gaucher disease*. Genome Res. 7: 1020-1026.
103. **SINGLETON DR**, WU TT, CASTLE JD. **1997**. *Three mammalian SCAMPs (secretory carrier membrane proteins) are highly related products of distinct genes having similar subcellular distributions*. J. Cell Sci. 110: 2099-2107.
104. **REZENDE-LIMA W**, PARREIRA KS, GARCIA-GONZALEZ M, RIVEIRA E, BANET JF, LENS XM. **2004**. *Homozygosity for uromodulin disorders: FJHN and MCKD-type 2*. Kidney Int. Aug;66(2):558-63.

105. **LENS XM**, BANET JF, OUTEDA P, BARRIO-LUCIA V. **2005**. *A novel pattern of mutation in uromodulin disorders: autosomal dominant medullary cystic kidney disease type 2, familial juvenile hyperuricemic nephropathy, and autosomal dominant glomerulocystic kidney disease*. Am J Kidney Dis. Jul;46(1):52-7
106. **WOLF MT**, KARLE SM, SCHWARZ S, ANLAUF M, ANLAUF M, GLAESER L, KROISS S, BURTON C, FEEST T, OTTO E, FUCHSHUBER A, HILDEBRANDT F. **2003**. *Refinement of the critical region for MCKD1 by detection of transcontinental haplotype sharing*. Kidney Int. Sep;64(3):788-92
107. **MURAI KK**, NGUYEN LN, IRIE F, YAMAGUCHI Y, PASQUALE EB, **2003**. *Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling*. Nat. Neurosci; 6, 153–160.
108. **FIALA JC**, SPACEK J, HARRIS KM. **2002b**. *Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders?* Brain Res. Rev. 39, 29–54;
109. **KAUFMANN WE**, MOSER HW. **2000**. *Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation*. Cereb. Cortex 10, 981–991
110. **RAMAKERS GJ**. **2002**. *Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition*. Trends Neurosci. 25, 191–199
111. **PRIMAKOFF P**, MYLES DG. **2000**. *The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity*. Trends Genet. 16: 83-87,
112. **HERREN B**, RAINES EW, ROSS R. **1997**. *Expression of a disintegrin-like protein in cultured human vascular cells and in vivo*. FASEB J;11: 173–80
113. **KOMIYA K**, ENOMOTO H, INOKI I, OKAZAKI S, FUJITA Y, IKEDA E, OHUCHI E, MATSUMOTO I, TOYAMA Y, OKADA Y. **2005**. *Expression of ADAM15 in rheumatoid synovium: up-regulation by vascular endothelial growth factor and possible implications for angiogenesis*. Arthritis Research & Therapy; 7 (6): 1158-1173.
114. **MOSNIER JF**, JARRY A, BOU-HANNA C, DENIS MG, MERLIN D, LABOISSE CL. **2006**. *ADAM15 upregulation and interaction with multiple binding partners in inflammatory bowel disease*. Lab Investigat. 86, 1064–1073
115. **FEDAK PWM**, MORAVEC CS, MCCARTHY PM, ALTAMENTOVA SM, WONG AP, SKRTIC M, VERMA S, WEISEL RD, LI R-K. **2006**. *Altered*

- Expression of Disintegrin Metalloproteinases and Their Inhibitor in Human Dilated Cardiomyopathy*. Circulation. 2006;113:238-245.
116. **LUM L, REID MS & BLOBE CP. 1998.** *Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15*. J of Biol Chem; 273: 26236–47;
117. **NATH D, SLOCOMBE PM, STEPHENS PE, WARN A, HUTCHINSON GR, YAMADA KM, ET AL. 1999.** *Interaction of metargidin (ADAM-15) with alphavbeta3 and alpha5beta1 integrins on different haemopoietic cells*. Journal of Cell Science, 112, 579–587. ;
118. **KRATZSCHMAR J, LUM L, BLOBEL CP. 1996.** *Metargidin, a membrane-anchored metalloprotease-disintegrin protein with an RGD integrin binding sequence*. J Biol Chem; 271: 4593–6.
119. **HORIUCHI K, WESKAMP G, LUM L, HAMMES H-P, CAI H, BRODIE TA, LUDWIG T, CHIUSAROLI R, BARON R, PREISSNER KT, MANOVA K, BLOBEL CP. 2003.** *Potential role for ADAM15 in pathological neovascularization in mice*. Molec. Cell. Biol. 23: 5614-5624, 2003.
120. **HOWARD L, NELSON KK, MACIEWICZ RA, BLOBEL CP. 1999.** *Interaction of the metalloprotease disintegrins MDC9 and MDC15 with two SH3 domain-containing proteins, endophilin I and SH3PX1*. J. Biol. Chem. 274: 31693-31699.
121. **WU E, CROUCHER PI, MCKIE N. 1997.** *Expression of members of the novel membrane linked metalloproteinase family ADAM in cells derived from a range of haematological malignancies*. Biochem Biophys Res Commun 235:437–442; .
122. **YASUI A, MATSUURA K, SHIMIZU E, HIJIIYA N, HIGUCHI Y, YAMAMOTO S. 2004.** *Expression of splice variants of the human ADAM15 gene and strong interaction between the cytoplasmic domain of one variant and Src family proteins Lck and Hck*. Pathobiology 71:185–192.
123. **BOHM BB, AIGNER T, GEHRSITZ A, BLOBEL CP, KALDEN JR, BURKHARDT H. 1999.** *Up-regulation of MDC15 (metargidin) messenger RNA in human osteoarthritic cartilage*. Arthritis Rheum 42:1946–1950.

124. **MARTIN J**, EYNSTONE LV, DAVIES M, WILLIAMS JD, STEADMAN R. **2002**. *The role of ADAM 15 in glomerular mesangial cell migration*. J Biol Chem 277:33683–33689.
125. **BEUTLER E**, GELBART T. **1998**. *Hematologically important mutations: Gaucher disease*. Blood Cells Mol Dis 24:2–8;
126. **KOPRIVICA V**, STONE DL, PARK JK, FRISH A, COHEN I, TAYEBI N, SIDRANSKY, E. **2000**. *An analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with Type 1 and Type 3 Gaucher disease*. Am J Hum Genet 66:1777–1786.
127. **HUANG G**, ZHANG M, ERDMAN SE. **2003**. *Posttranslational modifications required for cell surface localization and function of the fungal adhesion Aga1p*. Eukaryot Cell. Oct;2(5):1099-1114.
128. **MALAGOLINI N**, CAVALLONE D, SERAFINI-CESSI F. **1997**. *Intracellular transport, cell-surface exposure and release of recombinant Tamm-Horsfall glycoprotein*. Kidney Int. Nov;52(5):1340-50
129. **ALI S**, HALL J, HAZLEWOOD GP, HIRST BH, GILBERT HJ. **1996**. *A protein targetin signal that functions in polarized epithelial cells in vivo*. Biochem. J. May 1;315 (Pt 3):857-862.
130. **HWA KY**. **2001**. *Glycosyl Phosphatidylinositol-linked glycoconjugates: structure, biosynthesys and function*. Adv Exp Med Biol. 491:207-214. Review.
131. **KORNFELD S**. **1992**. *Structure and function of the monnose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptors*. Annu Rev Biochem., 61, 307-330
132. **SIMONS K**, IKONEN E. **1997**. *Functional rafts in cell membranes*. Nature, 387, 569-572
133. **ENGLUND PT**. **1993**. *The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors*. Annu Rev Biochem.;62:121-38. Review
134. **FERGUSON MA**. **1999**. *The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research*. J Cell Sci. Sep;112 (Pt 17):2799-809. Review
135. **SIMONS K**, WANDINGER-NESS A. **1990**. *Polarized sorting in epithelia*. Cell 62, 207–210

-
136. **MATTER K, MELLMAN I. 1994.** Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6,545–554
137. **MATTER K. 2000.** *Epithelial polarity: sorting out the sorters.* *Curr. Biol.* 10,R39-R42;
138. **IKONEN E. 2001.** *Roles of lipid rafts in membrane transport.* *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 470-477
139. **BROWN DA, CRISE B, ROSE JK. 1989.** *Mechanism of membrane anchoring affects polarised expression of two proteins in MDCK cells.* *Science* 245, 1499-1501.;
140. **LISANTI MP, DARNELL JC, CHAN BL, RODRIGUEZ-BOULAN E, SALTIEL AR. 1989.** *The distribution of glycosyl-phosphatidylinositol anchored proteins is differentially regulated by serum and insulin.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 824-832.;
141. **LISANTI MP, LE BIVIC A, SALTIEL AR, RODRIGUEZ-BOULAN E. 1990b.** *Preferred apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) anchored proteins: a highly conserved feature of the polarised epithelial cell phenotype.* *J. Membr. Biol.* 113, 155-167
142. **HUANG XF, COMPANS RW, CHEN S, LAMB RA, ARVAN P. 1997.** *Polarized apical targeting directed by the signal/anchor region of simian virus 5 hemagglutinin-neuraminidase.* *J. Biol. Chem.* 1, 27598-27604.;
143. **KUNDU A, AVALOS RT, SANDERSON CM, NAYAK DP. 1996.** *Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells.* *J. Virol.* 70, 6508-6515.;
144. **LIN S, NAIM HY, RODRIGUEZ AC, ROTH MG. 1998.** *Mutations in the middle of the transmembrane domain reverse the polarity of transport of the influenza virus hemagglutinin in MDCK epithelial cells.* *J. Cell Biol.* 142, 51-57
145. **ALI N, EVANS WH. 1990.** *Priority targeting of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins to the bile-canalicular (apical) plasma membrane of hepatocytes. Involvement of 'late' endosomes.* *Biochem. J.* 271, 193-199.;
146. **LISANTI MP, SARGIACOMO M, GRAEVE L, SALTIEL AR, RODRIGUEZ-BOULAN E. 1988.** *Polarised apical distribution of*

- glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line.* Proc.Natl. Acad. Sci. USA. 85, 9557-9561
147. **LISANTI MP**, CARAS IW, GILBERT T, HANZEL D, RODRIGUEZ-BOULAN E. **1990a.** *Vectorial apical delivery and slow endocytosis of a glycolipid anchored fusion protein in transfected MDCK cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 7419-7423.
148. **SOOLE KL**, JEPSON MA, HAZLEWOOD GP, GILBERT HJ, HIRST BH. **1995.** *Epithelial sorting of a glycosylphosphatidylinositol-anchored bacterial protein expressed in polarized renal MDCK and intestinal Caco-2 cells.* J. Cell Sci. 108, 369-377.
149. **ZURZOLO C**, LISANTI MP, CARAS IW, NITSCH L, RODRIGUEZ-BOULAN E. **1993.** *Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins are preferentially targeted to the basolateral surface in Fischer rat thyroid epithelial cells.* J. Cell Biol. 121:1031–1039.
150. **BROWN DA**, LONDON E. **1997.** *Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes?* Biochem Biophys Res Commun. 240: 1-7.
151. **BROWN DA**, ROSE JK. **1992.** *Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during Transport to the apical cell surface.* Cell. 68: 533-44.
152. **RIETVELD A**, SIMONS K. **1998.** *The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts.* Biochim Biophys Acta. 1404: 125-35.
153. **PEREZ P**, PUERTOLLANO R, ALONSO MA. **1997.** *Structural and biochemical similarities reveal a family of proteins related to the MAL proteolipid, a component of detergent-insoluble membrane microdomains.* Biochem Biophys Res Commun. Mar 27;232(3):618-21.
154. **RAZANI B**, WOODMAN SE, LISANTI MP. **2002.** *Caveolae: from cell biology to animal physiology.* Pharmacol. Rev. 54, 431-467.

155. **LISANTI MP**, TANG ZL, SARGIACOMO M. **1993**. *Caveolin forms a hetero-oligomeric protein complex that interacts with an apical GPI-linked protein: implications for the biogenesis of caveolae*. J Cell Biol. Nov;123(3):595-604.
156. **SCHEIFFELE P**, VERKADE P, FRA AM, VIRTÀ H, SIMONS K, IKONEN E. **1998**. *Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells*. J Cell Biol. Feb 23;140(4):795-806.
157. **DRAB M**, VERKADE P, ELGER M, KASPER M, LOHN M, LAUTERBACH B, MENNE J, LINDSCHAU C, MENDE F, LUFT FC, SCHEDL A, HALLER H, KURZCHALIA TV. **2001**. *Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice*. Science. Sep 28;293(5539):2449-52.
158. **SOTGIA F**, RAZANI B, BONUCCELLI G, SCHUBERT W, BATTISTA M, LEE H, CAPOZZA F, SCHUBERT AL, MINETTI C, BUCKLEY JT, LISANTI MP. **2002**. *Intracellular retention of glycosylphosphatidyl inositol-linked proteins in caveolin-deficient cells*. Mol Cell Biol. Jun;22(11):3905-26.
159. **ALONSO MA**, WEISSMAN SM. **1987**. *cDNA cloning and sequence of MAL, a hydrophobic protein associated with human T-cell differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A. Apr;84(7):1997-2001.
160. **KIM T**, FIEDLER K, MADISON DL, KRUEGER WH, PFEIFFER SE. **1995**. *Cloning and characterization of MVP17: a developmentally regulated myelin protein in oligodendrocytes*. J. Neurosci. Res. 42, 413-422.
161. **MILLÁN J**, ALONSO MA. **1998**. *MAL, a novel integral membrane protein of human T lymphocytes, associates with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and Src-like tyrosine kinases*. Eur. J. Immunol. 28, 3675-3684.
162. **MARTÍN-BELMONTE F**, KREMER L, ALBAR PJ, MARAZUELA M, ALONSO MA. **1998**. *Expression of the MAL gene in the thyroid: the MAL proteolipid, a component of glycolipid-enriched membranes, is apically distributed in thyroid follicles*. Endocrinology. 139, 2077-2084.
163. **WILSON SH**, BAILEY AM, NOURS CR, MATTEI MG, BYRNE JA. **2001**. *Identification of MAL2, a novel member of the MAL proteolipid family, through interactions with TPD52-like proteins in the yeast two-hybrid system*. Genomics. 76, 81-88.

164. **DE MARCO MC**, MARTÍN-BELMONTE F, KREMER L, ALBAR PJ, CORREAS I, VAERMAN JP, MARAZUELA M, BYRNE JA, ALONSO MA. **2002**. *MAL2, a novel raft protein of the MAL family, is an essential component of the machinery for transcytosis in hepatoma HepG2 cells*. J. Cell Biol. 159, 37-44.
165. **PUERTOLLANO R**, MARTIN-BELMONTE F, MILLAN J, DE MARCO MC, ALBAR JP, KREMER L, ALONSO MA. **1999**. *The MAL proteolipid is necessary for normal apical transport and accurate sorting of the influenza virus hemagglutinin in Madin-Darby canine kidney cells*. J Cell Biol. Apr 5;145(1):141-51.
166. **CHEONG KH**, ZACCHETTI D, SCHNEEBERGER EE, SIMONS K. **1999**. *VIP17/MAL, a lipid raft-associated protein, is involved in apical transport in MDCK cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. May 25;96(11):6241-8.
167. **MARTIN-BELMONTE F**, PUERTOLLANO R, MILLAN J, ALONSO MA. **2000**. *The MAL proteolipid is necessary for the overall apical delivery of membrane proteins in the polarized epithelial Madin-Darby canine kidney and fischer rat thyroid cell lines*. Mol Biol Cell. Jun;11(6):2033-45.
168. **MARTIN-BELMONTE F**, ARVAN P, ALONSO MA. **2001**. *MAL mediates apical transport of secretory proteins in polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cells*. J Biol Chem. Dec 28;276(52):49337-42.
169. **MARAZUELA M**, ACEVEDO A, ADRADOS M, GARCIA-LOPEZ MA, ALONSO MA. **2003**. *Expression of MAL, an integral protein component of the machinery for raft-mediated apical transport, in human epithelia*. J Histochem Cytochem. May;51(5):665-74.
170. **MARAZUELA M**, ACEVEDO A, GARCIA-LOPEZ MA, ADRADOS M, DE MARCO MC, ALONSO MA. **2004**. *Expression of MAL2, an integral protein component of the machinery for basolateral-to-apical transcytosis, in human epithelia*. J Histochem Cytochem. Feb;52(2):243-52.
171. **FRANK M**, ATANASOSKI S, SANCHÓ S, MAGYAR JP, RULICKE T, SCHWAB ME, SUTER U. **2000**. *Progressive segregation of unmyelinated axons in peripheral nerves, myelin alterations in the CNS, and cyst formation in the kidneys of myelin and lymphocyte protein-overexpressing mice*. J Neurochem. Nov;75(5):1927-39.

172. **MAGYAR JP**, EBENSPERGER C, SCHAEREN-WIEMERS N, SUTER U. **1997**. *Myelin and lymphocyte protein (MAL/MVP17/VIP17) and plasmolipin are members of an extended gene family*. *Gene*. Apr 21;189(2):269-75.
173. **HUANG Z-Q**, SANDERS PW. **1997**. *Localization of a single binding site for uromodulin light chains on human Tamm-Horsfall glycoprotein*. *J Clin Invest*. 99: 732-736.
174. **YING ZW**, SANDERS PW. **2001**. *Mapping the binding domain of immunoglobulin light chains for Tamm-Horsfall*. *Am J Pathol*.158:1859-1866.
175. **LIU W**, QIAN C, COMEAU K, BRENN T, FURTHMAYR H AND FRANCKE U. **1996**. *Mutation fibrillin-1 monomers lacking EGF-like domains disrupt microfibril assembly and cause severe Marfan syndrome*. *Hum. Mol. Genet*. 5:1581-1587.
176. **PUERTOLLANO R**, ALONSO MA. **1999**. *Substitution of the two carboxyl-terminal serines by alanine causes retention of MAL, a component of the apical sorting machinery, in the endoplasmic reticulum*. *Biochem Biophys Res Commun*. Jun 24;260(1):188-92.

VII. ANEXOS

ANEXO1.1.

Tabla 1.1. Relación de los genes descritos en la región acotada para el locus 1. En la tabla se recoge información sobre el lugar de inicio del gen, el final del gen, el símbolo más ampliamente utilizado para su localización, la cadena en donde se ubica **C** (+, cadena con sentido, - cadena antisentido), la región cromosómica en la que se encuentra el gen y finalmente una breve descripción que puede dar información sobre la función de su transcrito. En gris aparecen señalados los genes que ya han sido excluidos por secuenciación como candidatos de la enfermedad quística.

Símbolo	I	F	C	Mapa	Descripción
INTS3	151,96	152,01	+	1q21.3	integrator complex subunit 3
SLC27A3	152,01	152,01	+	1q21.3	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 3
LOC343052	152,03	152,04	+	1q21.3	similar to putative neuronal cell adhesion molecule
GATAD2B	152,04	152,06	-	1q21.3	GATA zinc finger domain containing 2B
LOC645965	152,09	152,09	-	1q21.3	similar to Adipophilin (Adipose differentiation-related protein) (ADRP)
DENND4B	152,16	152,18	-	1p36.13-q31.3	DENN/MADD domain containing 4B
CRTC2	152,18	152,19	-	1q21.3	CREB regulated transcription coactivator 2
SLC39A1	152,19	152,20	-	1q21	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 1
CREB3L4	152,20	152,21	+	1q21.3	cAMP responsive element binding protein 3-like 4
JTB	152,21	152,21	-	1q21	jumping translocation breakpoint
RAB13	152,22	152,22	-	1q21.2	RAB13, member RAS oncogene family
RPS27	152,22	152,23	+	1q21	ribosomal protein S27 (metalloprotein 1)
NUP210L	152,23	152,37	-	1q21.3	nucleoporin 210kDa-like
TPM3	152,39	152,43	-	1q21.2	tropomyosin 3
C1orf189	152,43	152,44	-	1q21.3	chromosome 1 open reading frame 189
C1orf43	152,44	152,45	-	1q21.2	chromosome 1 open reading frame 43
UBAP2L	152,46	152,50	+	1q21.3	ubiquitin associated protein 2-like
HAX1	152,51	152,51	+	1q21.3	HCLS1 associated protein X-1
LOC653690	152,55	152,55	+	1q21.3	similar to aquaporin 10
AQP10	152,56	152,56	+	1q21.3	aquaporin 10
LOC729598	152,56	152,56	-	1q21.3	hypothetical protein LOC729598
ATP8B2	152,56	152,59	+	1q21.3	ATPase, Class I, type 8B, member 2
MRPS33P1	152,61	152,61	-	1q21.3	mitochondrial ribosomal protein S33 pseudogene 1
IL6R	152,64	152,70	+	1q21	interleukin 6 receptor
SHE	152,71	152,74	-	1q21.3	Src homology 2 domain containing E
TDRD10	152,74	152,78	+	1q21.3	tudor domain containing 10
UBE2Q1	152,78	152,79	-	1q21.3	ubiquitin-conjugating enzyme E2Q (putative) 1
CHRNA2	152,80	152,81	+	1q21.3	cholinergic receptor, nicotinic, beta 2 (neuronal)
ADAR	152,82	152,86	-	1q21.1-q21.2	adenosine deaminase, RNA-specific
KCNN3	152,94	153,10	-	1q21.3	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 3
PMVK	153,16	153,19	-	1p13-q23	phosphomevalonate kinase

<i>Símbolo</i>	<i>I</i>	<i>F</i>	<i>C</i>	<i>Mapa</i>	<i>Descripción</i>
PBXIP1	153,18	153,19	-	1q21.3	pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein 1
PYGO2	153,19	153,20	-	1q21.3	pygopus homolog 2 (Drosophila)
SHC1	153,20	153,21	-	1q21	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming p1
CKS1B	153,21	153,21	+	1q21.2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B
FLAD1	153,22	153,23	+	1q21.3	FAD1 flavin adenine dinucleotide synthetase homolog (S. cerevisiae)
LENEP	153,23	153,23	+	1q22	lens epithelial protein
ZBTB7B	153,25	153,25	+	1q21.3	zinc finger and BTB domain containing 7B
DCST2	153,25	153,27	-	1q21.3	DC-STAMP domain containing 2
DCST1	153,27	153,29	+	1q21.3	DC-STAMP domain containing 1
ADAM15	153,29	153,30	+	1q21.3	ADAM metalloproteinase domain 15 (metargidin)
EFNA4	153,30	153,30	+	1q21-q22	ephrin-A4
EFNA3	153,31	153,32	+	1q21-q22	ephrin-A3
EFNA1	153,36	153,37	+	1q21-q22	ephrin-A1
RAG1AP1	153,37	153,37	+	1q22	recombination activating gene 1 activating protein 1
DPM3	153,37	153,37	-	1q22	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 3
KRTCAP2	153,40	153,41	-	1q22	keratinocyte associated protein 2
TRIM46	153,41	153,42	+	1q22	tripartite motif-containing 46
MUC1	153,42	153,42	-	1q21	mucin 1, cell surface associated
THBS3	153,43	153,44	-	1q21	thrombospondin 3
MTX1	153,44	153,45	+	1q21	metaxin 1
GBAP	153,45	153,45	-	1q21	glucosidase, beta; acid, pseudogene
MTX1P	153,46	153,47	+	1q21	metaxin 1 pseudogene
GBA	153,47	153,48	-	1q21	glucosidase, beta; acid (includes glucosylceramidase)
C1orf2	153,48	153,49	-	1q21	chromosome 1 open reading frame 2
SCAMP3	153,49	153,49	-	1q21	secretory carrier membrane protein 3
CLK2	153,49	153,50	-	1q21	CDC-like kinase 2
HCN3	153,51	153,52	+	1q22	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 3
PKLR	153,52	153,53	-	1q21	pyruvate kinase, liver and RBC
FDPS	153,54	153,55	+	1q22	farnesyl diphosphate synthase (farnesyl pyrophosphate synthetase, dimethylallyltransferase, geranyltransferase)
C1orf104	153,55	153,56	-	1q22	chromosome 1 open reading frame 104
RUSC1	153,56	153,56	+	1q21-q22	RUN and SH3 domain containing 1
ASH1L	153,57	153,79	-	1q22	ash1 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila)
MIRN555	153,58	153,58	-	1q22	microRNA 555
LOC645682	153,66	153,67	+	1q22	similar to POU domain, class 5, transcription factor 1-like protein3
LOC645676	153,79	153,80	+	1q22	hypothetical protein LOC645676

<i>Símbolo</i>	<i>I</i>	<i>F</i>	<i>C</i>	<i>Mapa</i>	<i>Descripción</i>
LOC284620	153,82	153,82	-	1q22	similar to claudin 6
MRPS29P1	153,83	153,83	+	1q21.3	mitochondrial ribosomal protein S29 pseudogene 1
MSTO1	153,84	153,85	+	1q22	misato homolog 1 (Drosophila)
YY1AP1	153,89	153,92	-	1q22	YY1 associated protein 1
DAP3	153,92	153,97	+	1q21-q22	death associated protein 3
GON4L	153,98	154,09	-	1q22	gon-4-like (C.elegans)
SYT11	154,09	154,12	+	1q21.2	synaptotagmin XI
RIT1	154,13	154,14	-	1q22	Ras-like without CAAX 1
KIAA0907	154,14	154,17	-	1q22	KIAA0907
SNORA42	154,15	154,15	-	1q22	small nucleolar RNA, H/ACA box 42
SCARNA4	154,16	154,16	-	1q22	small Cajal body-specific RNA 4
RXFP4	154,17	154,17	+	1q22	relaxin/insulin-like family peptide receptor 4
ARHGEF2	154,18	154,21	-	1q21-q22	rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2
SSR2	154,24	154,25	-	1q21-q23	signal sequence receptor, β (translocon-associated protein β)
UBQLN4	154,27	154,29	-	1q21	ubiquilin 4
MAPBPIP	154,29	154,29	+	1q22	mitogen-activated protein-binding protein-interacting protein
RAB25	154,29	154,30	+	1q22	RAB25, member RAS oncogene family
LOC92312	154,30	154,31	-	1q22	hypothetical protein LOC92312
LOC729773	154,31	154,33	+	1q22	similar to lamin A/C
LMNA	154,35	154,37	+	1q21.2-q21.3	lamin A/C
SEMA4A	154,39	154,41	+	1q22	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4A
KIAA0446	154,43	154,44	+	1q22	KIAA0446 gene product
PMF1	154,44	154,47	+	1q12	polyamine-modulated factor 1
BGLAP	154,47	154,47	+	1q25-q31	bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein (osteocalcin)
PAQR6	154,47	154,48	-	1q22	progesterone and adipoQ receptor family member VI
SMG5	154,48	154,51	-	1q21.2	Smg-5 homolog, nonsense mediated mRNA decay factor (C. elegans)
TMEM79	154,51	154,52	+	1q22	transmembrane protein 79
C1orf85	154,52	154,53	-	1q22	chromosome 1 open reading frame 85
VHLL	154,53	154,53	-	1q22	von Hippel-Lindau tumor suppressor-like
CCT3	154,54	154,57	-	1q23	chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma)
C1orf182	154,57	154,58	+	1q22	chromosome 1 open reading frame 182
RHBG	154,60	154,62	+	1q21.3	Rh family, B glycoprotein
C1orf61	154,64	154,66	-	1q22	chromosome 1 open reading frame 61
MIRN9-1	154,65	154,65	-	1q22	microRNA 9-1
MEF2D	154,70	154,73	-	1q12-q23	MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide D (myocyte enhancer factor 2D)
IQGAP3	154,76	154,80	-	1q22-q23.1	IQ motif containing GTPase activating protein 3

<i>Símbolo</i>	<i>I</i>	<i>F</i>	<i>C</i>	<i>Mapa</i>	<i>Descripción</i>
TTC24	154,81	154,82	+	1q23.1	tetratricopeptide repeat domain 24
APOA1BP	154,82	154,83	+	1q22-q21.2	apolipoprotein A-I binding protein
GPATC4	154,83	154,83	-	1q22	G patch domain containing 4
HAPLN2	154,85	154,86	+	1q23.1	hyaluronan and proteoglycan link protein 2
BCAN	154,87	154,89	+	1q31	brevican
NES	154,90	154,91	-	1q23.1	nestin
CRABP2	154,93	154,94	-	1q21.3	cellular retinoic acid binding protein 2
ISG20L2	154,95	154,96	-	1q23.1	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa-like 2
C1orf66	154,96	154,97	+	1q23.1	chromosome 1 open reading frame 66
MRPL24	154,97	154,97	-	1q21-q22	mitochondrial ribosomal protein L24
HDGF	154,97	154,98	-	1q21-q23	hepatoma-derived growth factor (high-mobility group protein 1-like)
PRCC	155,00	155,03	+	1q21.1	papillary renal cell carcinoma (translocation-associated)
SH2D2A	155,04	155,05	-	1q21	SH2 domain protein 2A
NTRK1	155,05	155,11	+	1q21-q22	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1
INSRR	155,07	155,09	-	1q21-q23	insulin receptor-related receptor
PEAR1	155,13	155,15	+	1q23.1	platelet endothelial aggregation receptor 1
C1orf92	155,15	155,16	+	1q23.1	chromosome 1 open reading frame 92
ARHGEF11	155,17	155,28	-	1q21	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 11
LOC246784	155,29	155,29	-	1q21.3	homolog of C. elegans smu-1 pseudogene
LOC149501	155,30	155,31	+	1q23.1	similar to Keratin, type II cytoskeletal 8 (Cytokeratin-8) (CK-8) (Keraton-8) (K8)
FLJ16478	155,32	155,33	-	1q23.1	FLJ16478 protein
CYCSP52	155,36	155,36	+	1q22	cytochrome c, somatic pseudogene 52
ETV3	155,36	155,37	-	1q21-q23	ets variant gene 3
LOC729853	155,74	155,75	-	1q23.1	similar to Fc receptor-like 5
FCRL5	155,74	155,78	-	1q21	Fc receptor-like 5
FCRL4	155,81	155,83	-	1q21	Fc receptor-like 4
FCRL3	155,91	155,93	-	1q21-q22	Fc receptor-like 3
LOC148300	155,94	155,94	+	1q23.1	son-pseudogene
LOC391106	155,96	155,96	-	1q23.1	similar to Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC-1) (hVDAC1) (Outer mitochondrial membrane protein porin 1) (Plasmalemmal porin) (Porin 31HL) (Porin 31HM)

ANEXO 1.2

Tabla 1.2.. Relación de los genes descritos en la región acotada para el locus 3, entre los marcadores DIS3470 y DIS1644. En la tabla se recoge información sobre el lugar de inicio del gen, el final del gen, el símbolo más ampliamente utilizado para su localización, la cadena en donde se ubica C (+, cadena con sentido, - cadena antisentido), la región cromosómica en la que se encuentra el gen y finalmente una breve descripción que puede dar información sobre la función de su transcrito. En rojo aparecen señalados los genes que ya han sido excluidos por secuenciación como candidatos de la enfermedad quística.

Símbolo	Inicio	Final	C	Mapa	Descripción
LOC647132	188,22	188,22	-	1q31.1	Similar to DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 29
FAM5C	188,33	188,71	-	1q31.1	Family with sequence similarity 5, member C
LOC647140	188,85	188,85	-	1q31.1	Similar to SET domain and mariner transposase fusion gene
LOC440704	188,86	189,03	+	1q31.1-2	Hypothetical gene supported by BC042042
LOC647146	189,47	189,47	+	1q31.2	Hypothetical protein LOC647146
LOC647149	190,11	190,24	+	1q31.2	Hypothetical protein LOC647149
RGS18	190,39	190,42	+	1q31.2	Regulator of G-protein signalling 18
LOC647150	190,48	190,48	-	1q31.2	Similar to ATP-binding cassette sub-family E1 (RNase L Inhibitor) (Ribonuclease 4 inhibitor) (RNS4I)
RGS1	190,81	190,81	+	1q31	Regulator of G-protein signalling 1
RGS13	190,87	190,89	+	1q31.2	Regulator of G-protein signalling 13
LOC388720	190,95	190,9	+	1q31.2	Similar to ba92k2.2 (similar to ubiquitin)
RGS2	191,04	191,04	+	1q31	Regulator of G-protein signalling 2, 24kda
UCHL5	191,25	191,29	-	1q32	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5
TROVE2	191,29	191,32	+	1q31	TROVE domain family, member 2
GLRX2	191,33	191,34	-	1q31.2-3	Glutaredoxin 2
CDC73	191,35	191,48	+	1q25	Cell division cycle 73, Paf1/RNA polymerase II complex component, Homolog (S. Cerevisiae)
B3GALT2	191,41	191,42	-	1q31	UDP-Galβglcnae β 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 2
LOC647161	192,05	192,05	-	1q31.2	Hypothetical protein LOC647161
LOC647165	192,35	192,35	+	1q31.3	Hypothetical protein LOC647165
LOC647167	192,42	192,42	+	1q31.3	Similar to eukaryotic translation elongation factor 1 α 2
LOC647170	193,63	193,63	-	1q31.3	Similar to SET domain & mariner transposase fusion gene
KCNT2	194,46	194,84	-	1q31.3	Potassium channel, subfamily T, member 2
CFH	194,88	194,98	+	1q32	Complement factor H
CFHL4	195,01	195,15	+	1q32	Complement factor H-related 4
CFHL3	195,01	195,02	+	1q32	Complement factor H-related 3
CFHL1	195,05	195,06	+	1q32	Complement factor H-related 1
CFHL2	195,17	195,19	+	1q31-q32.1	Complement factor H-related 2
CFHL5	195,21	195,24	+	1q22-23	Complement factor H-related 5
F13B	195,27	195,30	-	1q31-32.1	Coagulation factor XIII, B polypeptide

Símbolo	Inicio	Final	C	Mapa	Descripción
ASPM	195,32	195,38	-	1q31	Asp abnormal spindle, microcephaly associated (Drosophila)
ZBTB41	195,38	195,43	-	1q31.3	Zinc finger and BTB domain containing 41
LOC127011	195,45	195,45	+	1q31.3	Similar to ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal protein 2
CRB1	195,50	195,71	+	1q31-32.1	Crumbs homolog 1 (Drosophila)
MRPS21P3	195,59	195,59	+	1q31.2	Mitochondrial ribosomal protein S21 pseudogene 3
FLJ20054	195,74	195,78	-	1q31.3	Hypothetical protein FLJ20054
DENND1B	195,78	196,01	-	1q31.3	DENN/MADD domain containing 1B
C1orf53	196,13	196,14	+	1q31.3	Chromosome 1 open reading frame 53
LHX9	196,14	196,16	+	1q31-32	LIM homeobox 9
LOC647195	196,43	196,43	-	1q31.3	Hypothetical protein LOC647195
NEK7	196,46	196,55	+	1q31.3	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 7
ATP6V1G3	196,75	196,77	-	1q31.3	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 13kda, V1 subunit G3
PTPRC	196,87	196,99	+	1q31-32	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
LOC647198	197,06	197,06	-	1q31.3	Hypothetical protein LOC647198
LOC647201	197,47	197,60	+	1q31.3-q32.1	Similar to 60S ribosomal protein l23a
LOC647202	197,62	197,62	+	1q32.1	Similar to eukaryotic translation elongation factor 1 α 1
LOC647204	197,98	197,98	+	1q32.1	Similar to heat-responsive protein 12
NR5A2	198,26	198,41	+	1q32.1	Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2
FAM58B	198,44	198,45	+	1q32.1	Family with sequence similarity 58, member B
LOC647209	198,56	198,56	+	1q32.1	Hypothetical protein LOC647209
ZNF281	198,64	198,64	-	1q32.1	Zinc finger protein 281
KIF14	198,78	198,8	-	1pter-q31.3	Kinesin family member 14
DDX59	198,85	198,90	-	1q32.1	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 59
CAMSAP1L1	198,97	199,09	+	1q32.1	Calmodulin regulated spectrin-associated protein 1-like 1
GPR25	199,10	199,10	+	1q32.1	G protein-coupled receptor 25
C1orf106	199,12	199,15	+	1q32.1	Chromosome 1 open reading frame 106
LOC647215	199,15	199,19	+	1q32.1	Hypothetical protein LOC647215
LOC647216	199,19	199,20	+	1q32.1	Hypothetical protein LOC647216
KIF21B	199,20	199,25	-	1pter-q31.3	Kinesin family member 21B
CACNA1S	199,27	199,34	-	1q32	Ca channel, voltage-dependent, L type, α 1S subunit
LOC647219	199,35	199,35	-	1q32.1	Similar to Achaete-scute homolog 3 (Mash-3)
TMEM9	199,37	199,39	-	1q41	Transmembrane protein 9
LOC440706	199,42	199,44	+	1q32.1	Similar to hypothetical protein FLJ37794
DKFZp434B1231	199,44	199,46	+	1q32.1	Eef1a2 binding protein
PKP1	199,51	199,56	+	1q32	Plakophilin 1 ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome
TNNT2	199,59	199,61	-	1q32	Troponin T type 2 (cardiac)
LAD1	199,61	199,63	-	1q25.1-32.3	Ladinin 1
TNNI1	199,63	199,65	-	1q31.3	Troponin I type 1 (skeletal, slow)

Símbolo	Inicio	Final	C	Mapa	Descripción
PHLDA3	199,70	199,70	-	1q31	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 3
CSRP1	199,71	199,74	-	1q32	Cysteine and glycine-rich protein 1
LOC376693	199,75	199,75	+	1q32.1	Hypothetical LOC376693
LOC647225	199,85	199,86	+	1q32.1	Hypothetical protein LOC647225
NAV1	199,88	200,06	+	1q32.3	Neuron navigator 1
IPO9	200,06	200,11	+	1q32.1	Importin 9
TMEM58	200,12	200,12	+	1q32.1	Transmembrane protein 58
LMOD1	200,13	200,18	-	1q32	Leiomodin 1 (smooth muscle)
TIMM17A	200,19	200,20	+	1q32.1	Translocase of inner mitochondrial m.17 homolog A yeast
LOC391151	200,21	200,21	+	1q32.1	Ribosomal protein L10 pseudogene
RNPEP	200,21	200,24	+	1q32	Arginyl aminopeptidase (aminopeptidase B)
ELF3	200,24	200,25	+	1q32.2	E74-like factor 3 (ETS domain TF, epithelial-specific)
GPR37L1	200,35	200,36	+	1q32.1	G-protein coupled receptor 37 like 1
ARL8A	200,36	200,38	-	1q32.1	ADP-ribosylation factor-like 8A
PTPN7	200,38	200,39	-	1q32.1	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 7
PTPRV	200,40	200,42	+	1q32.1	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, V pseudogene
LGR6	200,42	200,55	+	1q32.1	Leu-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 6
UBE2T	200,56	200,57	-	1q32.1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2T (putative)
PPP1R12B	200,58	200,82	+	1q32.1	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B
CYCSP4	200,60	200,60	-	1q32.1	Cytochrome c, somatic pseudogene 4
LOC653805	200,70	200,70	-	1q32.1	Similar to ribosomal protein S27
LOC647056	200,76	200,76	+	1q32.1	Hypothetical protein LOC647056
LOC647052	200,78	200,79	+	1q32.1	Hypothetical protein LOC647052
SYT2	200,83	200,94	-	1q32.1	Synaptotagmin II
JARID1B	200,96	201,04	-	1q32.1	Jumonji, AT rich interactive domain 1B (RBP2-like)
LOC163556	201,05	201,06	+	1q32.1	Similar to RIKEN cdna 4931440L10
LOC647059	201,08	201,09	-	1q32.1	Similar to tubulin, α 8 like
LOC148709	201,10	201,11	+	1q32.1	Hypothetical protein LOC148709
RABIF	201,11	201,12	-	1q32-q41	RAB interacting factor
KLHL12	201,12	201,16	-	1q32.1	Kelch-like 12 (Drosophila)
ADIPOR1	201,17	201,19	-	1p36.13-q41	Adiponectin receptor 1
LOC647243	201,19	201,19	+	1q32.1	Hypothetical protein LOC647243
CYB5R1	201,19	201,20	-	1p36.13-q41	Cytochrome b5 reductase 1
LOC401980	201,22	201,22	-	1q32.1	Similar to hypothetical protein
C1orf37	201,24	201,25	+	1q32.1	Chromosome 1 open reading frame 37
LOC647246	201,26	201,28	+	1q32.1	Similar to PTPRF interacting protein α 2
PPFIA4	201,28	201,31	+	1q32.1	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), Interacting protein (liprin), α 4
MYOG	201,31	201,32	-	1q31-q41	Myogenin (myogenic factor 4)

Símbolo	Inicio	Final	C	Mapa	Descripción
ADORA1	201,32	201,40	+	1q32.1	Adenosine A1 receptor
MYBPH	201,40	201,41	-	1q32.1	Myosin binding protein H
CHI3L1	201,41	201,42	-	1q32.1	Chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)
CHIT1	201,45	201,46	-	1q31-q32	Chitinase 1 (chitotriosidase)
BTG2	201,54	201,54	+	1q32	BTG family, member 2
FMOD	201,57	201,58	-	1q32	Fibromodulin
PRELP	201,71	201,72	+	1q32	Proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein
OPTC	201,72	201,74	+	1q32.1	Opticin
LOC647250	201,76	201,76	-	1q32.1	Hypothetical protein LOC647250
ATP2B4	201,86	201,97	+	1q32.1	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 4
MGC5457	201,96	201,96	+	1q32.1	Hypothetical protein MGC5457
LAX1	202,00	202,01	+	1q32.1	Lymphocyte transmembrane adaptor 1
ZC3H11A	202,03	202,08	+	1q32.1	Zinc finger CCCH-type containing 11A
LOC647252	202,04	202,04	-	1q32.1	Similar to Charged multivesicular body protein 5, Chromatin difying protein 5 (Vacuolar protein sorting 60) (Vps60) (hvps60) (SNF7 domain-containing protein 2)
SNRPE	202,09	202,10	+	1q32	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide E
LOC391155	202,10	202,10	-	1q32.1	Similar to cytokeratin 8
C1orf157	202,26	202,27	-	1q32.1	Chromosome 1 open reading frame 157
SOX13	202,30	202,36	+	1q32	SRY (sex determining region Y)-box 13
ETNK2	202,36	202,38	-	1q32.1	Ethanolamine kinase 2
REN	202,39	202,40	-	1q32	Renin
KISS1	202,42	202,43	-	1q32	Kiss-1 metastasis-suppressor
GOLT1A	202,43	202,44	-	1q32.1	Golgi transport 1 homolog A (S. Cerevisiae)
PLEKHA6	202,45	202,59	-	1q32.1	Pleckstrin homology domain containing, fam. A member 6
LOC641293	202,58	202,58	-	1q32.1	Ribosomal protein L21 pseudogene
PPP1R15B	202,63	202,64	-	1q32.1	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15B
PIK3C2B	202,65	202,72	-	1q32	Phosphoinositide-3-kinase, class 2, β polypeptide
MDM4	202,75	202,80	+	1q32	Mdm4, transformed 3T3 cell double minute 4, p53 binding protein (mouse)
LRRN5	202,85	202,92	-	1q32.1	Leucine rich repeat neuronal 5
NFASC	203,06	203,25	+	1q32.1	Neurofascin homolog (chicken)
CNTN2	203,27	203,31	+	1q32.1	Contactin 2 (axonal)
LOC388730	203,31	203,32	-	1q32.1	Similar to RIKEN cdna 4930429O20
RBBP5	203,32	203,35	-	1q32	Retinoblastoma binding protein 5
RIPK5	203,37	203,44	-	1q32.1	Receptor interacting protein kinase 5
TMCC2	203,46	203,50	+	1q32.1	Transmembrane and coiled-coil domain family 2
NUAK2	203,53	203,55	-	1q32.1	NUAK family, SNF1-like kinase, 2
KLHDC8A	203,57	203,59	-	1q32.1	Kelch domain containing 8A

Símbolo	Inicio	Final	C	Mapa	Descripción
LEMD1	203,61	203,65	-	1q32.1	LEM domain containing 1
LOC284577	203,69	203,70	+	1q32.1	Hypothetical protein LOC284577
PCTK3	203,74	203,76	+	1q31-q32	PCTAIRE protein kinase 3
MFSD4	203,80	203,83	+	1q32.1	Major facilitator superfamily domain containing 4
LOC653827	203,83	203,83	+	1q32.1	Similar to major facilitator s.family domain containing 4
ELK4	203,85	203,86	-	1q32	ELK4, ETS-domain protein (SRF accessory protein 1)
SLC45A3	203,89	203,91	-	1q32.1	Solute carrier family 45, member 3
NUCKS1	203,95	203,98	-	1q32.1	Nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate1
RAB7L1	204,00	204,01	-	1q32	RAB7, member RAS oncogene family-like 1
SLC41A1	204,02	204,04	-	1q32.1	Solute carrier family 41, member 1
FLJ32569	204,06	204,08	-	1q32.1	Hypothetical protein FLJ32569
SLC26A9	204,14	204,17	-	1q31-q32	Solute carrier family 26, member 9
LOC641694	204,27	204,30	-	1q32.1	Similar to SLIT-ROBO Rho gtpase-activating protein 2 (srgap2) (Formin-binding protein 2)
LOC641706	204,29	204,30	-	1q32.1	Hypothetical protein LOC641706
LOC653573	204,30	204,32	+	1q32.1	Similar to family with sequence similarity 72, member A
AVPR1B	204,39	204,39	+	1q32	Arginine vasopressin receptor 1B
C1orf186	204,40	204,45	-	1q32.1	Chromosome 1 open reading frame 186
LOC642299	204,44	204,45	-	1q32.1	Hypothetical protein LOC642299
CTSE	204,48	204,49	+	1q31	Cathepsin E
LOC642323	204,57	204,57	-	1q32.1	Similar to Rap1 gtpase-GDP dissociation stimulator 1 (SMG P21 stimulatory GDP/GTP exchange protein) (SMG GDS protein)
SRGAP2	204,58	204,70	+	1q32.1	SLIT-ROBO Rho gtpase activating protein 2
IKBKE	204,71	204,73	+	1q32.1	Inhibitor of K light polypeptide enhancer in B-cells, k epsilon
C1orf147	204,73	204,73	-	1q32.1	Chromosome 1 open reading frame 147
RASSF5	204,74	204,82	+	1q32.1	Ras association (ralgds/AF-6) domain family 5
LGTN	204,83	204,85	-	1q31-q32	Ligatin
DYRK3	204,87	204,88	+	1q32.1	Dual-specificity tyr-(Y)-phosphorylation regulated kinase 3
MAPKAPK2	204,92	204,97	+	1q32	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2
IL10	205,00	205,01	-	1q31-q32	Interleukin 10
IL19	205,03	205,08	+	1q32.2	Interleukin 19
IL20	205,10	205,10	+	1q32	Interleukin 20
IL24	205,13	205,14	+	1q32	Interleukin 24
FAIM3	205,14	205,16	-	1q32.1	Fas apoptotic inhibitory molecule 3
PIGR	205,16	205,18	-	1q31-q41	Polymeric immunoglobulin receptor
FCAMR	205,19	205,21	-	1q32.1	Fc receptor, iga, igm, high affinity
LOC653098	205,25	205,26	-	1q32.1	Similar to chromosome 1 open reading frame 116

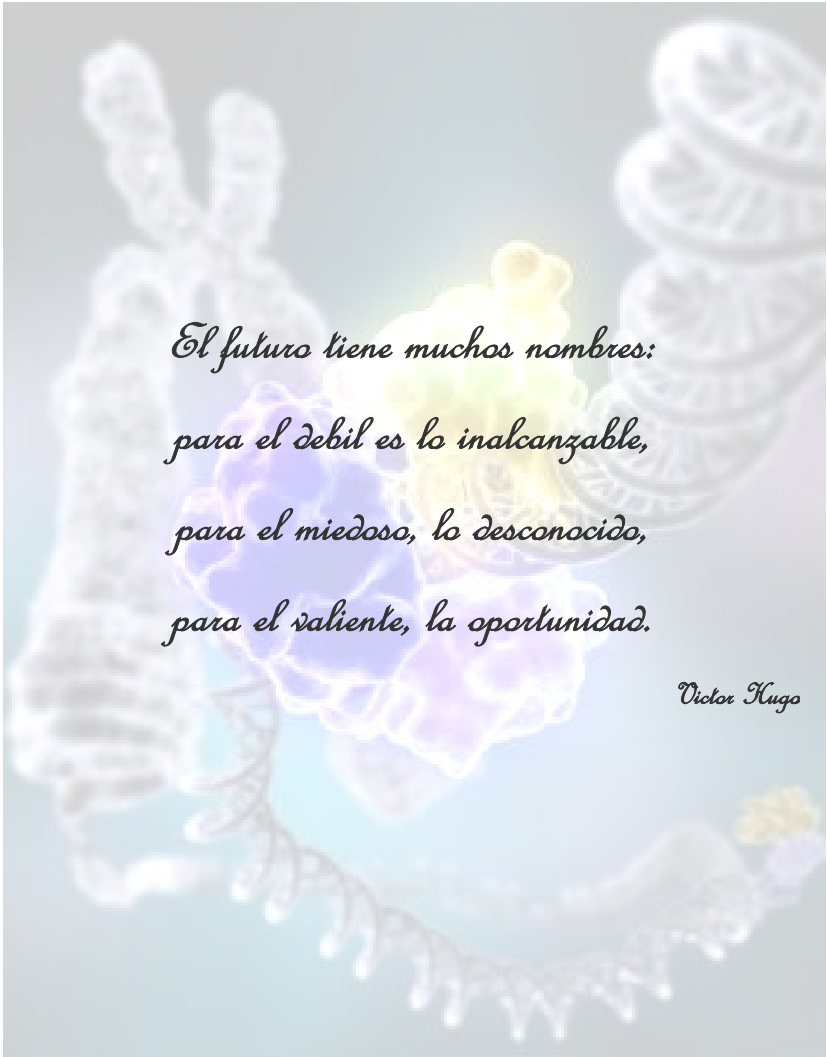
Símbolo	Inicio	Final	C	Mapa	Descripción
C1orf116	205,25	205,27	-	1q32.1	Chromosome 1 open reading frame 116
YOD1	205,28	205,29	-	1q32.1	YOD1 OTU deubiquinating enzyme 1 homolog (yeast)
PFKFB2	205,29	205,32	+	1q31	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2
C4BPB	205,32	205,33	+	1q32	Complement component 4 binding protein, β
C4BPA	205,34	205,38	+	1q32	Complement component 4 binding protein, α
C4BPAL2	205,46	205,46	+	1q32	Complement component 4 binding protein, α -like 2
DAF	205,56	205,60	+	1q32	Decay accelerating factor (CD55, Cromer blood group)
CR2	205,69	205,72	+	1q32	Complement component (3d/Epstein Barr virus) receptor 2
CR1	205,73	205,88	+	1q32	Complement component (3b/4b) R 1 (Knops blood group)
CR1L	205,88	205,97	+	1q32.1	Complement component (3b/4b) receptor 1-like
MCP	205,99	206,03	+	1q32	Membrane cofactor protein (CD46, trophoblast-lymphocyte cross-reactive antigen)
C1orf132	206,05	206,10	-	1q32.2	Chromosome 1 open reading frame 132
CD34	206,12	206,15	-	1q32	CD34 antigen
PLXNA2	206,26	206,48	-	1q32.2	Plexin A2
LOC391157	207,41	207,41	+	1q32.2	Similar to GRB2-related adaptor protein
LOC642758	207,47	207,47	+	1q32.2	Hypothetical protein LOC642758
LOC391158	207,47	207,47	+	1q32.2	Similar to TF Dp-1 (E2F dimerization partner 1) (DRTF1)
ATP5GP1	207,50	207,50	-	1q32.2	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c
LOC642806	207,60	207,61	+	1q32.2	Hypothetical protein LOC642806
LOC642587	207,66	207,67	+	1q32.2	Hypothetical protein LOC642587
CAMK1G	207,82	207,85	+	1q32-q41	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IG
LAMB3	207,85	207,89	-	1q32	Laminin, β 3
G0S2	207,91	207,91	+	1q32.2-q41	G0/g1switch 2
HSD11B1	207,92	207,97	+	1q32-q41	Hydroxysteroid (11- β) dehydrogenase 1
ADORA2BP	207,98	207,98	+	1q32	Adenosine A2b receptor pseudogene
TRAF3IP3	207,99	208,02	+	1q32.3-q41	TRAF3 interacting protein 3
C1orf74	208,02	208,02	-	1q32.2	Chromosome 1 open reading frame 74
IRF6	208,02	208,04	-	1q32.3-q41	Interferon regulatory factor 6
C1orf107	208,06	208,09	+	1q32.2	Chromosome 1 open reading frame 107
LOC653164	208,09	208,09	+	1q32.2	Similar to chromosome 1 open reading frame 107
SYT14	208,17	208,40	+	1q32.2	Synaptotagmin XIV
C1orf133	208,47	208,47	-	1q32.2	Chromosome 1 open reading frame 133
SERTAD4	208,47	208,48	+	1q32.1-q41	SERTA domain containing 4
LOC642964	208,50	208,51	-	1q32.2	Similar to heat shock 70kd protein binding protein
RNASEH1P3	208,54	208,54	+	1q32.2	Ribonuclease H1 pseudogene 3
HHAT	208,56	208,91	+	1q32	Hedgehog acyltransferase
LOC642723	208,69	208,70	+	1q32.2	Hypothetical protein LOC642723

Símbolo	Inicio	Final	C	Mapa	Descripción
LOC642718	208,86	208,86	+	1q32.2	Hypothetical protein LOC642718
KCNH1	208,92	209,37	-	1q32-q41	K voltage-gated channel, subf. H, member 1
LOC642989	209,38	209,41	+	1q32.2	Similar to 40S ribosomal protein S25
LOC388734	209,44	209,44	+	1q32.2	PX19 pseudogene
RCOR3	209,49	209,55	+	1q32.2-32.3	REST corepressor 3
TRAF5	209,56	209,61	+	1q32	TNF receptor-associated factor 5
C1orf97	209,62	209,67	+	1q32.3	Chromosome 1 open reading frame 97
LOC391160	209,68	209,68	+	1q32.3	Similar to ARP2/3 (p21-ARC) (Actin-related protein 2/3 subunit 3)
C1orf36	209,71	209,73	-	1q32.3	Chromosome 1 open reading frame 36
SLC30A1	209,81	209,81	-	1q32-q41	Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1
LOC401981	209,90	209,90	-	1q32.3	Similar to farnesyl diphosphate synthase
NEK2	209,90	209,91	-	1q32.2-q41	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2
LPGAT1	209,98	210,07	-	1p36.13-q42.3	Lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1
C1orf73	210,18	210,27	-	1p36.13-q42.3	Chromosome 1 open reading frame 73
DTL	210,27	210,34	+	1q32.1-q32.2	Denticleless homolog (Drosophila)
LOC653156	210,29	210,29	-	1q32.3	Similar to 60S ribosomal protein L21
LOC643143	210,46	210,52	-	1q32.3	Hypothetical protein LOC643143
PPP2R5A	210,52	210,60	+	1q32.2-q32.3	Protein phosphatase 2, regulatory unit B (B56), α isof.
LOC642880	210,53	210,53	+	1q32.3	Similar to similar to FKSG62
C1orf75	210,60	210,65	-	1q32.3	Chromosome 1 open reading frame 75
NENF	210,67	210,68	+	1q32.3	Neuron derived neurotrophic factor
ATF3	210,80	210,86	+	1q32.3	Activating transcription factor 3
FAM71A	210,86	210,86	+	1q32.3	Family with sequence similarity 71, member A
SNFT	210,92	210,93	-	1q32.3	Jun dimerization protein p21snft
C1orf48	210,97	211,03	-	1q41	Chromosome 1 open reading frame 48
TATDN3	211,03	211,05	+	1q32.3	Tatd dnase domain containing 3
LOC149643	211,07	211,08	-	1q32.3	Hypothetical LOC149643
LOC642946	211,09	211,09	-	1q32.3	Hypothetical protein LOC642946
FLVCR	211,09	211,13	+	1q32.3	Feline leukemia virus subgroup C cellular receptor
FLJ12505	211,19	211,23	+	1q32.3	Hypothetical protein FLJ12505
ANGEL2	211,23	211,25	-	1q32.3	Angel homolog 2 (Drosophila)
RPS6KC1	211,29	211,51	+	1q41	Ribosomal protein S6 kinase, 52kda, polypeptide 1
LOC643330	211,66	211,68	-	1q32.3	Similar to ribosomal protein L31
PROX1	212,22	212,27	+	1q32.2-q32.3	Prospero-related homeobox 1
SMYD2	212,52	212,57	+	1q41	SET and MYND domain containing 2
PTPN14	212,59	212,79	-	1q32.2	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 14
LOC643454	212,72	212,72	-	1q41	Similar to Adapter-relat. protein complex3 γ 1 subunit (γ -adaptin 3a) (AP-3 complex γ -3A subunit) (γ -3A-adaptin)

Símbolo	Inicio	Final	C	Mapa	Descripción
LOC643471	212,77	212,77	+	1q41	Similar to Keratin, type I cytoskeletal 18 Cytokeratin-18
CENPF	212,84	212,90	+	1q32-q41	Centromere protein F, 350/400ka (mitosin)
LOC643035	212,84	212,84	-	1q41	Similar to CG33096-PB, isoform B
LOC391162	213,11	213,12	+	1q41	Similar to Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
KCNK2	213,24	213,47	+	1q41	Potassium channel, subfamily K, member 2
LOC643536	213,61	213,61	+	1q41	Similar to Voltage-dependent anion channel 1 (VDAC-1) (Plasmalemmal porin) (Porin 31HL) (Porin 31HM)
KCTD3	213,80	213,86	+	1q41	Potassium channel tetramerisation domain containing 3
USH2A	213,86	214,66	-	1q41	Usher syndrome 2A (autosomal recessive, mild)
MRPS18BP1	214,44	214,44	-	1q41	Mitochondrial ribosomal protein S18B pseudogene 1
ESRRG	214,74	215,32	-	1q41	Estrogen-related receptor gamma
GPATC2	215,67	215,87	-	1q41	G patch domain containing 2
LOC128153	215,87	216,10	+	1q41	Hypothetical protein BC014608
UBBP2	216,09	216,09	-	1q32	Ubiquitin B pseudogene 2
LOC643649	216,24	216,25	+	1q41	Hypothetical protein LOC643649
CGI-115	216,52	216,57	+	1q41	CGI-115 protein
LOC391165	216,57	216,58	+	1q41	Similar to 40S ribosomal protein S26
TGFB2	216,58	216,68	+	1q41	Transforming growth factor, β 2
LOC643717	217,15	217,16	-	1q41	Hypothetical protein LOC643717
LOC643723	217,32	217,41	-	1q41	Hypothetical protein LOC643723
LYPLAL1	217,41	217,45	+	1q41	Lysophospholipase-like 1
LOC643136	217,84	217,87	-	1q41	Similar to Zinc finger CCCH-type domain containing protein 11A
SLC30A10	218,15	218,16	-	1q41	Solute carrier family 30, member 10
EPRS	218,20	218,28	-	1q41-q42	Glutamyl-prolyl-trna synthetase
BPNT1	218,29	218,32	-	1q41	3'(2'), 5'-bisphosphate nucleotidase 1
IARS2	218,33	218,38	+	1q41	Isoleucine-trna synthetase 2, mitochondrial
RAB3GAP2	218,39	218,51	-	1q41	RAB3 gtpase activating protein subunit 2 (non-catalytic)
MORF4LP1	218,49	218,49	+	1q41-q42	Mortality factor 4 like pseudogene 1
STK6P	218,50	218,50	-	1q41-q42	Serine/threonine kinase 6 pseudogene
LOC127086	218,55	218,55	-	1q41	Similar to ATP-dependent DNA helicase II, (Ku70) (Thyroid-lupus autoantigen) (TLAA) (CTC box binding factor 75 kda subunit) (CTCBF) (CTC75)
LOC643779	218,55	218,55	-	1q41	Similar to acidic ribosomal phosphoprotein P0
MARK1	218,76	218,90	+	1q41	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1
C1orf115	218,93	218,93	+	1q41	Chromosome 1 open reading frame 115
MOSC2	218,98	219,02	+	1q41	MOCO sulphurase C-terminal domain containing 2
MOSC1	219,02	219,05	+	1q41	MOCO sulphurase C-terminal domain containing 1
HLX1	219,11	219,12	+	1q41-q42.1	H2.0-like homeobox 1 (Drosophila)

Símbolo	Inicio	Final	C	Mapa	Descripción
C1orf140	219,56	219,57	-	1q41	Chromosome 1 open reading frame 140
DUSP10	219,94	219,98	-	1q41	Dual specificity phosphatase 10
KIAA1822L	220,76	220,78	-	1q41	KIAA1822-like
TAF1A	220,79	220,82	-	1q42	TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, A, 48kda
UNQ6077	220,85	220,90	+	1q41	C219-reactive peptide
C1orf80	220,90	220,95	-	1q41	Chromosome 1 open reading frame 80
C1orf58	220,95	220,97	+	1q41	Chromosome 1 open reading frame 58
FLJ43505	220,97	220,99	+	1q41	FLJ43505 protein
LOC644053	221,03	221,07	+	1q41	Hypothetical protein LOC644053
DISP1	221,16	221,24	+	1q41	Dispatched homolog 1 (Drosophila)
TLR5	221,35	221,38	-	1q41-q42	Toll-like receptor 5
SUSD4	221,46	221,60	-	1q41	Sushi domain containing 4
C1orf65	221,63	221,63	+	1q41	Chromosome 1 open reading frame 65
LOC644151	221,78	221,78	-	1q41	Similar to calpain 8
LOC653428	228,05	221,81	-	1q41	Similar to BTB (POZ) domain containing 14A
LOC388743	221,87	221,92	-	1q41	Similar to calpain 8
CAPN2	221,96	222,03	+	1q41-q42	Calpain 2, (m/II) large subunit
TP53BP2	222,03	222,10	-	1q42.1	Tumor protein p53 binding protein, 2
LOC644214	222,11	222,11	-	1q42.11	Similar to prohibitin
LOC644220	222,11	222,11	-	1q42.11	Similar to cytoplasmic β -actin
LOC644230	222,19	222,20	-	1q42.11	Hypothetical protein LOC644230
LOC441124	222,20	222,21	-	1q42.11	Hypothetical gene supported by AK093729; BX647918
LOC644243	222,23	222,24	-	1q42.11	Similar to general transcription factor II I
LOC441920	222,24	222,29	-	1q42.11	Similar to F-box only protein 25 isoform 3; F-box protein Fbx25; F-box only protein 25
FBXO28	222,36	222,41	+	1q42.11	F-box protein 28
DEGS1	222,43	222,44	+	1q42.11	Degenerative spermatocyte homolog 1, lipid desaturase (Drosophila)
NVL	222,48	222,58	-	1q41-q42.2	Nuclear VCP-like
CNIH4	222,61	222,63	+	1q42.11	Cornichon homolog 4 (Drosophila)
WDR26	222,63	222,68	-	1q42.11	WD repeat domain 26
LOC401982	222,82	222,82	+	1q42.12	Similar to aldose reductase
CNIH3	222,87	222,99	+	1q42.12	Cornichon homolog 3 (Drosophila)
C1orf67	223,18	223,27	+	1q42.12	Chromosome 1 open reading frame 67
LOC644364	223,28	223,37	+	1q42.12	Similar to CG7092-PA
LOC644374	223,37	223,39	+	1q42.12	Similar to CG7092-PA
LOC127602	223,40	223,65	+	1q42.12	Similar to RIKEN cdna A230079K17
LOC644389	223,61	223,65	+	1q42.12	Similar to dynein, axonemal, heavy polypeptide 1

Símbolo	Inicio	Final	C	Mapa	Descripción
LBR	223,65	223,68	-	1q42.1	Lamin B receptor
LOC653311	223,66	223,66	+	1q42.12	Similar to lamin B receptor
ENAH	223,74	223,90	-	1q42.12	Enabled homolog (Drosophila)
SRP9	224,03	224,04	+	1q42.12	Signal recognition particle 9kda
LEFTY3	224,05	224,05	+	1q42.1	LEFTY family pseudogene
EPHX1	224,07	224,09	+	1q42.1	Epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)
TMEM63A	224,09	224,13	-	1q42.12	Transmembrane protein 63A
LEFTY1	224,14	224,14	-	1q42.1	Left-right determination factor 1
PYCR2	224,17	224,17	-	1q42.12	Pyrroline-5-carboxylate reductase family, member 2
LEFTY2	224,19	224,19	-	1q42.1	Left-right determination factor 2
LOC644482	224,21	224,21	+	1q42.12	Similar to NADH (ubiquinone) 1 α subcomplex, 3, 9kda
C1orf55	224,23	224,25	-	1q42.12	Chromosome 1 open reading frame 55
H3F3A	224,31	224,32	+	1q41	H3 histone, family 3A
ACBD3	224,39	224,44	-	1q42.12	Acyl-Coenzyme A binding domain containing 3
MIXL1	224,47	224,48	+	1q42.12	Mix1 homeobox-like 1 (Xenopus laevis)
LIN9	224,48	224,56	-	1q42.12	Lin-9 homolog (C. Elegans)
PARP1	224,61	224,66	-	1q41-q42	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1
LOC391168	224,69	224,69	+	1q42.12	Similar to ribosomal protein s3a; 40S ribosomal protein s3a; v-fos transformation effector protein 1
LOC391169	224,74	224,74	-	1q42.12	Similar to hypothetical protein D11Ert497e
C1orf95	224,80	224,85	+	1q42.12	Chromosome 1 open reading frame 95
ITPKB	224,88	224,99	-	1q42.13	Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B



*El futuro tiene muchos nombres:
para el débil es lo inalcanzable,
para el miedoso, lo desconocido,
para el valiente, la oportunidad.*

Victor Hugo



Departamento de Medicina.
Universidad de Santiago de Compostela

La enfermedad renal quística medular (cuyas siglas en inglés son MCKD) junto con la nefronoptosis (NPH) son incluidas en un mismo grupo de nefritis túbulo-intersticial conocido como complejo NPH-MCKD. Ambas comparten características morfológicas pero se diferencian principalmente en la edad de debut y tipo de herencia: la NPH es juvenil recesiva con insuficiencia renal crónica terminal (IRCT) en la segunda década de vida, mientras que la MCKD es dominante e IRCT en la quinta década de vida.

En la MCKD existen al menos tres genes distintos implicados responsables de la MCKD1, MCKD 2 y MCKD3 localizados en los cromosomas 1q21, 1q41 y 16p12 respectivamente. En treinta y siete familias se ha visto la existencia de una nefropatía autosómica dominante y se han recolectado y evaluado más de 80 individuos afectados y no afectados. El estudio mutacional del gen UMOD identificó 4 familias con mutación y se efectuó un análisis de haplotipos para los loci 1 y 3 en 10 familias distintas. El análisis de haplotipos reveló al menos tres familias con ligamiento significativo al locus 1 y al menos una familia excluyó ambos loci.

Se ha hecho una búsqueda mutacional en al menos un paciente afecto de cada familia en 9 genes distintos del locus 1, excluyéndose como responsables de la enfermedad.

Se excluyeron los genes MAL y MAL2 como responsables de la MCKD por otros loci todavía no identificados.